

**U. PORTO**



**FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**Tiago Jorge Dias Farinha**

**Prevalência e Resistência aos antibióticos de isolados de Infecções do  
Trato Urinário na zona de Castelo Branco**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de  
Mestre em Análises Clínicas

Trabalho realizado sob a orientação:

**Professora Doutora Helena Maria Neto Ferreira de Sousa**

**Porto**

**Setembro de 2012**

### **Declaração de reprodução**

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO/TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

## **Agradecimentos**

Ao longo desta jornada, foram muitas as pessoas e instituições que contatei e a que, nesta fase, gostava de agradecer toda a ajuda e todo o apoio que me forneceram.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, especialmente à professora Maria de São José e ao Professor Dr. Franklim, coordenadores do Mestrado em Análises Clínicas pela ajuda que me deram e ao tempo que disponibilizaram para me colocar em estágio.

Quero agradecer todo apoio e toda a paciência demonstrada pela minha orientadora, a Prof. Dr<sup>a</sup> Helena Sousa, nas longas conversas e tardes durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço igualmente à Dra. Ana Sofia Jorge que me recebeu de braços abertos e a toda a sua fantástica equipa de trabalho, técnicas e técnicos superiores que me integraram desde o primeiro dia de estágio e me forneceram competências pessoais e profissionais que levarei para sempre na minha futura vida profissional.

Quero agradecer a amabilidade que a Dra. Idalina Melfe teve em ceder-me gentilmente os resultados do seu laboratório, demonstrando uma concorrência saudável e leal que possibilitou um maior abrangimento dos dados.

Um agradecimento particular aos responsáveis da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias (ESALD) do Instituto Politécnico de Castelo Branco que me cederam as suas instalações, nomeadamente a Biblioteca, local onde pude escrever e aceder a toda a bibliografia disponível que consolidaram este trabalho.

Por último, agradeço aos meus pais, família e amigos todo o apoio incansável que me deram desde o primeiro momento em que iniciei este estudo, sem cujo apoio nada disto seria possível.

## **Frase**

*"But I would like to sound one note of warning... It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body."*

**Alexander Fleming**

## Resumo

A infecção do trato urinário (ITU) é a situação clínica mais comum na população mundial. Nesses casos, a análise bacteriológica de urina é prescrita pelo médico quando o paciente demonstra sintomas de disúria, urgência ao urinar e dor suprapúbica. As análises clínicas são nestes casos fundamentais, pois fornecem os resultados pelos quais é possível identificar não só o agente responsável pela patologia como também orientar uma terapêutica. O tratamento é realizado com base em antibióticos, no entanto o seu uso descontrolado pode favorecer a criação de resistências e o aparecimento de bactérias multirresistentes na população. Tendo em conta esta problemática, este trabalho tem como objetivo estudar a prevalência da patologia e dos agentes bacterianos que a causam, a atual resistência aos antibióticos na população e a problemática das bactérias multirresistentes, bem como a prevalência e a origem das mesmas. Foram estudadas 10061 análises bacteriológicas de urina referentes ao ano 2011, a partir dos únicos laboratórios privados de Castelo Branco. Este trabalho demonstrou que *Escherichia coli* é a prevalente na população em estudo, estando presente em 60% dos casos, seguida por *Proteus spp* e *Klebsiella spp*. *Pseudomonas spp* é a que maior percentagem de resistência apresenta e, em alguns casos, a todas as famílias de antibióticos estudados. Nitrofurantoína e a associação Trimetoprim/Sulfametoxazol são os antibióticos em relação aos quais se deteta menos resistência. A bactéria multirresistente prevalente neste estudo foi *Klebsiella spp*, no entanto aparecem três casos de *Acinetobacter baumannii* multirresistente aos antibióticos na comunidade. Castelo Branco foi o concelho da área estudada que apresentou mais casos de bactérias multirresistentes na comunidade. Foram ainda descritos 27 isolados multirresistentes presentes em Unidades de Cuidados Continuados (UCC) da região. O trabalho revelou uma prevalência das bactérias responsáveis por ITU semelhante às das encontradas em outras investigações em diferentes regiões e países, no entanto comprova a necessidade de desenvolvimento de um compromisso local constante no combate às resistências e na adaptação dos protocolos de tratamento às realidades locais.

**Palavras-chave:** ITU, prevalência, resistência aos antibióticos, bactérias multirresistentes

## Abstract

Urinary tract infection (UTI) is the most common medical condition in the world population. The bacteriological examination of urine is prescribed by the doctor when the patient shows symptoms of dysuria, urgency to urinate and suprapubic pain. In these cases, the clinical analyzes are essential because they provide the results whereby it is possible to identify not only the agents responsible for the pathology but also therapeutic orientation. The treatment is based on antibiotics, however their use promotes uncontrolled resistance and appearance of multiresistant bacteria in the population. According to this problem, this study aims to investigate the prevalence of the pathology and the bacterial agents that cause it. It also aims to study the current antibiotic resistance in the population and the problem of multiresistant bacteria prevalence and origin. 10061 urine samples were analyzed, for the year 2011, from the two private laboratories of Castelo Branco. This study showed that *Escherichia coli* is prevalent in the population being present in 60% of the cases, followed by *Proteus spp* and *Klebsiella spp.* *Pseudomonas spp* is the one that has the highest percentage of resistance including some isolates resistant to all of the antibiotic families studied. Nitrofurantoin and the association of Trimethoprim/Sulfametoxazol are the antibiotics that show less number of resistant isolates. The prevalent multiresistant bacteria in this study was *Klebsiella spp*, however there are three cases of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the community. Castelo Branco was the county of the studied area that showed the most cases of multidrug-resistant bacteria in the community, it was also described 27 multidrug-resistant isolates present in Long-term Care Units (CCU) of the region. The study revealed the prevalence of bacteria responsible for UTI like those found in other investigations in different regions and countries, however it proves the need to develop a local commitment in order to combat the constant resistance and the adjustment of treatment protocols to the local realities.

**Keywords:** UTI, prevalence, antibiotic resistance, multidrug-resistant bacteria

## Índice

Agradecimentos .....	iii
Frase.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice de figuras.....	viii
Índice de tabelas .....	viii
Índice de gráficos .....	ix
Lista de abreviaturas e símbolos .....	x
<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>Material e Métodos .....</b>	<b>3</b>
Desenho do estudo.....	3
Caracterização da zona de estudo.....	3
Metodologia .....	7
Laboratorial.....	7
Laboratório A .....	7
Laboratório B .....	8
Princípio de identificação das colónias em CPS .....	10
<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>11</b>
Prevalência de ITU .....	12
Resistência aos antibióticos.....	17
Urinas em que foram isolados 2 agentes bacterianos .....	20
Bactérias multirresistentes/Vitek 2 Compact .....	22
Análise do fenótipo de resistência de isolados apresentando multirresistência seleccionados no estudo.....	31
<b>Conclusão.....</b>	<b>37</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>39</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>42</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 – Área do estudo

Figura 2 – Área afetada por bactérias multirresistentes

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Percentagens de resistência de bactérias Gram negativas isoladas em mulheres

Tabela 2 – Percentagens de resistência de bactérias Gram negativas isoladas em homens

Tabela 3 – Percentagens de resistência de bactérias Gram positivas isoladas em mulheres

Tabela 4 – Percentagens de resistência de bactérias Gram positivas isoladas em homens

Tabela 5 – Percentagens de resistência de bactérias Gram negativas multirresistentes isoladas em mulheres

Tabela 6 – Percentagens de resistência de bactérias Gram negativas multirresistentes isoladas em homens

Tabela 7 – Percentagens de resistência de bactérias Gram positivas multirresistentes isoladas em homens

Tabela 8 – Perfil de resistência de bactérias multirresistentes pertencentes ao género *Klebsiella spp* na zona de estudo

Tabela 9 – Perfil de resistência de bactérias *Escherichia coli* multirresistentes na zona de estudo

Tabela 10 – Perfil de resistência de bactérias multirresistentes pertencentes ao género *Proteus spp* na zona de estudo

Tabela 11 – Perfil de resistência de bactérias multirresistentes pertencentes ao género *Pseudomonas spp* na zona de estudo

Tabela 12 - Perfil de resistência de bactérias *Acinetobacter baumannii* multirresistentes na zona de estudo

Tabela 13 – Perfil de resistência de bactérias Gram positivas multirresistentes na zona de estudo



## **Índice de gráficos**

Gráfico 1 – Prevalência de ITU na zona de estudo

Gráfico 2 – Prevalência de ITU na zona de estudo por género

Gráfico 3 – Prevalência de bactérias responsáveis por ITU na zona de estudo

Gráfico 4 – Prevalência total das bactérias isoladas em ambos os géneros

Gráfico 5 – Distribuição de bactérias Gram negativas nas mulheres

Gráfico 6 – Distribuição de bactérias Gram positivas nas mulheres

Gráfico 7 – Distribuição de bactérias Gram negativas nos homens

Gráfico 8 – Distribuição de bactérias Gram positivas nos homens

Gráfico 9 – Casos de isolamento de dois agentes bacterianos durante 2011

Gráfico 10 – Prevalência de bactérias multirresistentes

Gráfico 11 – Prevalência de bactérias multirresistentes consoante o posto de colheita

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

ITU – Infecção do Trato Urinário

ESBL – Extended-spectrum beta-lactamase (sigla em inglês)

MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (sigla em inglês)

NDM-1 – New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (sigla em inglês)

CPS – Meio cromogénico para isolamento e identificação de bactérias responsáveis por ITU

TSA – Teste de Sensibilidade aos Antibacterianos

INE – Instituto Nacional de Estatística

UFC – Unidade formadora de colónia

ATBUR – Conjunto de antibióticos direcionado para bacilos Gram negativos presentes na urina

Api Staph – Galeria identificativa de bactérias do género *Staphylococcus spp*, *Micrococcus spp* e *Kocuria spp*.

ATB Staph – Conjunto de antibióticos direcionado para *Staphylococcus spp*

ATB Pse – Conjunto de antibióticos direcionado para *Pseudomonas spp*

KESC – *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*

ID 32 E – Galeria de identificação de bactérias da família *Enterobacteriaceae*

KPC – *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase

UCC – Unidade de Cuidados Continuados

VRE – Vancomycin-Resistant Enterococci (sigla em inglês)

VRSA – Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (sigla em inglês)

# **Prevalência e Resistência aos antibióticos de isolados de Infecções do Trato Urinário (ITU) na zona de Castelo Branco**

## **Introdução**

A infecção do trato urinário (ITU) é uma situação clínica que se refere à presença de microrganismos patogénicos no trato urinário (1), sendo a infecção bacteriana mais comum que afeta a população humana (1, 2) e a mais vista na medicina generalista (3). Esta infecção é encontrada tanto em hospitais como na comunidade (4).

A epidemiologia da ITU varia sobretudo consoante o sexo e a idade (2). As pessoas idosas, maioritariamente mulheres (5), crianças e bebés (6) são dos grupos mais atingidos e, embora todas as pessoas se encontrem sujeitas a ITU, existem subpopulações onde o risco de ter ITU é consideravelmente maior, como grávidas, pacientes com deformações na espinal medula e/ou cateterizados, pacientes com diabetes, com HIV, com esclerose múltipla e com deformações no trato genito-urinário (1). Exceto nos primeiros meses de vida, as mulheres são mais afetadas com ITU do que os homens (1) devido a variáveis clínicas, diferenças anatómicas, efeitos hormonais e padrões comportamentais (7).

A sintomatologia da ITU é diversificada e varia consoante o local da infeção. Dificuldade em urinar, frequência e urgência ao urinar, dor supra-púbica são alguns sintomas da cistite. A pielonefrite é detetada quando há febre, dor abdominal, com ou sem sintomas de cistite, podendo agravar o estado clínico e passar a pielonefrite severa quando ocorre vômito e náusea. No caso da bacteriúria, esta pode ser assintomática quando não tem qualquer ligação com a sintomatologia de ITU, por exemplo em mulheres com diabetes mas pode ser prejudicial em grávidas (2), ou pode ser sintomática levando à evolução para sepsis ou choque séptico quando há atingimento de órgãos, acidose láctica e oligúria. (8).

A classificação da ITU varia consoante o local da infeção. Quando esta se encontra confinada ou presente no trato urinário inferior ou bexiga, designa-se por uretrite e cistite; quando a infeção se encontra no trato urinário superior ou no aparelho renal/próstata, é denominada de pielonefrite ou prostatite (9).

Esta presença de infecção nos vários locais do aparelho urinário indica a gravidade da situação clínica. Assim, a presença de infecção na bexiga é menos grave do que a infecção no rim.

A presença de deformações, quer a nível estrutural quer a nível funcional, do trato genito-urinário são muito complicadas e de mau prognóstico no tratamento. As causas são várias (obstrutivas, metabólicas, funcionais) e afetam um grupo restrito de pacientes, entre os quais pacientes cateterizados. A ITU nestes casos afeta homens e mulheres de igual modo. (2).

Na população em geral, é fator de risco o fato de ser mulher. Cerca de 50% de todas as mulheres irão reportar pelo menos uma ITU sintomática durante toda a sua vida. A idade também é relevante. Nestes casos, nas mulheres jovens, a ITU está mais associada com a frequente e recente atividade sexual e nas mulheres idosas está associado à atrofia da mucosa vaginal. A atividade sexual e o uso de contraceptivos, como espermicidas, são também importantes para a infecção e a sua recorrência. (9).

A grande maioria de microrganismos isolados que causam ITU na comunidade pertencem à família *Enterobacteriaceae* (7) e como forma de tratamento de ITU surge o uso de antibióticos. No entanto, o uso descontrolado de antibióticos fez com que as bactérias desenvolvessem mecanismos de resistência contra esses mesmos antibióticos e seja, agora, cada vez mais difícil o seu controlo. (8). Embora vários programas, organizações mundiais e europeias tentem identificar os principais agentes causadores de ITU, nenhum se focou, ainda, na capacidade de resistência adquirida pelas bactérias (10), na comunidade.

Numa altura em que tem sido observado um aumento de inúmeras bactérias multirresistentes, como as produtoras de ESBL (*Extended-spectrum beta-lactamase*), MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à metilicina) e o aparecimento da primeira bactéria pan-resistente aos antibióticos, *Escherichia coli* produtora de NDM-1, descrita recentemente no Reino Unido e que se acredita poder espalhar-se pelo resto da Europa, agora, mais que nunca, urologistas, médicos de clínica geral, microbiologistas e especialistas de doenças infecciosas têm de trabalhar em conjunto, pois só um prudente uso dos antibióticos pode tentar controlar este problema (8) e um adequado controlo da infecção.

## Material e Métodos

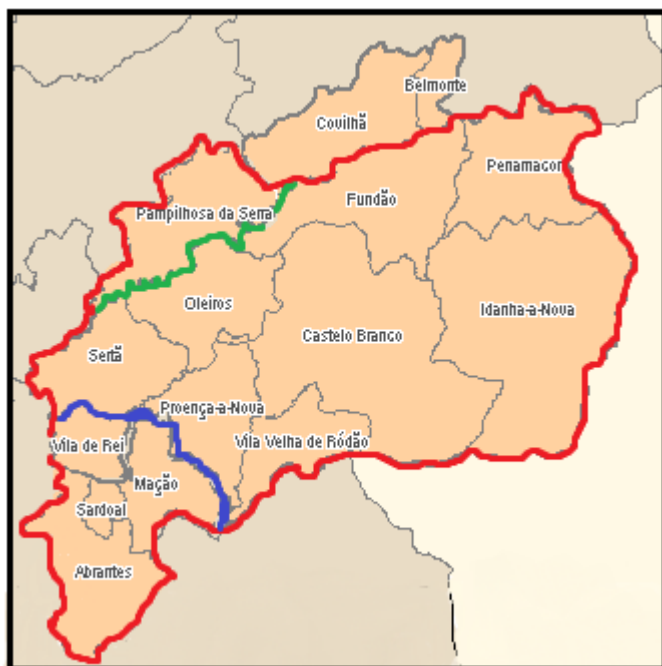
### Desenho do Estudo

Este estudo foi desenhado com o objetivo de saber a prevalência e resistência aos antibacterianos dos organismos isolados em colheitas de urina para análise bacteriológica, permitindo, assim, inferir a prevalência da ITU na população abrangida durante o ano de 2011. Foi realizado através da recolha e cedência de dados fornecidos por ambos os laboratórios de Análises Clínicas situados em Castelo Branco (Laboratório A e laboratório B). Após a recolha de dados, procedeu-se ao seu tratamento e processamento através do programa Microsoft® Excel 2007. O resultado final resulta num processo descritivo com uma abordagem quantitativa.

No laboratório A, o estagiário, participou ativamente na triagem e processamento da amostra com execução de técnicas no laboratório de microbiologia, a fim de obter isolamento bacteriano na urina. Participou também na identificação, discussão e verificação de isolamentos bacterianos em meio CPS e respetivos testes de sensibilidade aos antibacterianos (TSA).

No laboratório B, analisou e registou apenas dados referentes ao objetivo do estudo, não participando nos processos de tratamento e processamento da urina nem identificação de isolamentos bacterianos, bem como os respetivos testes de sensibilidade aos antibacterianos.

### Caracterização da Zona de Estudo



A zona de amostra da população situa-se na região centro de Portugal, mais propriamente nos distritos de Castelo Branco, Santarém e Coimbra que incluem diferentes zonas estatísticas, tais como o Pinhal Interior Norte (Alvaiázere, Ansião, Arganil, Castanheira de Pêra, Figueiró dos Vinhos, Góis, Lousã, Miranda do Corvo, Oliveira do Hospital, Pampilhosa da Serra, Pedrógão Grande, Penela, Tábua e Vila

Figura 1 - Área do estudo

Nova de Poiares) a Beira Interior Sul (Castelo Branco, Idanha-a-Nova, Penamacor e Vila Velha de Ródão), a Cova da Beira (Belmonte, Covilhã e Fundão), o Pinhal Interior Sul (Proença-a-Nova, Oleiros, Sertão, Mação e Vila de Rei) e Médio Tejo (Abrantes, Sardoal, Constância, Alcanena, Entroncamento, Ferreira do Zêzere, Ourém, Tomar, Torres Novas e Vila Nova da Barquinha) (11). No entanto, nem todos os concelhos destas sub-regiões serão abrangidos neste estudo. Abrantes e Sardoal são os únicos concelhos da sub-região Médio Tejo que serão analisados juntamente com o concelho da Pampilhosa da Serra da sub-região Pinhal Interior Norte. Fundão é o único concelho a ser abrangido na sub-região da Cova da Beira.

A área de estudo encontra-se representada na figura 1: a vermelho encontra-se delimitada a área total de amostragem; o azul e verde separa os diferentes distritos que foram analisados; a sudoeste o distrito de Santarém e a noroeste o distrito de Coimbra.

Com o objetivo de analisar a área de estudo, procedeu-se à recolha de dados estatísticos de dois laboratórios privados, os únicos, no concelho de Castelo Branco. Em 2011, existiam também outros dois laboratórios a atuar na zona de estudo e, embora pertencendo ao mesmo grupo, possuem um nicho de trabalho que não é sobreposto com os laboratórios de Castelo Branco. Ainda assim, análises de certos postos de colheitas referenciados por esses laboratórios eram encaminhadas para os laboratórios de Castelo Branco (como exemplo o Posto Medicir em Castelo Branco e os postos de colheita dos concelhos de Abrantes, Sardoal, Vila de Rei e Mação).

O laboratório A, presente na cidade de Castelo Branco, apresenta as valências de Bioquímica, Imunologia e Endocrinologia, Hematologia e Microbiologia. O seu volume de análises por dia, em 2011, varia entre 250 a 300.

O Laboratório B, também ele situado na cidade de Castelo Branco apresenta as mesmas valências que o laboratório A, mas um menor volume de trabalho e de análises por dia, variando entre 100 a 200.

Em 2011, os postos de colheita do laboratório A englobam dois distritos acima referidos, Santarém e Castelo Branco.

No distrito de Santarém, só os concelhos de Abrantes, Sardoal e Mação englobam postos de colheitas e só uma pequena percentagem de freguesias é amostrada.

Assim, no concelho de Abrantes, existem dois postos de colheitas, ambos situados na cidade, mas em diferentes zonas. No concelho de Sardoal, só existe um único posto de colheita que se situa na sede do município. No concelho de Mação, encontram-se postos de colheita nas sedes de freguesia de Cardigos, Carvoeiro, Envendos e Amêndoa e ainda um posto na aldeia de Vales de Cardigos.

No distrito de Castelo Branco, os concelhos amostrados são os concelhos de Castelo Branco, Idanha-a-Nova, Oleiros, Vila de Rei, Vila Velha de Ródão, Sertã, Proença-a-Nova e Penamacor. Os concelhos da Covilhã, Fundão e Belmonte encontram-se fora do alcance deste laboratório.

Os postos de colheita no concelho de Castelo Branco são na freguesia de Alcains, Santo André das Tojeiras, São Vicente da Beira, Mata, Lardosa, Lousa, Sarzedas, Escalos de Cima, Tinalhas, Almaceda, Freixial, Juncal, Salgueiro e Sobral do Campo, Cebolais de Cima e Póvoa de Rio de Moinhos, incluindo os quatro postos na cidade. Os postos de colheita no concelho do Fundão situam-se somente nas freguesias de Janeiro de Cima, Bogas de Baixo e Bogas de Cima. No concelho de Idanha-a-Nova, encontra-se um posto de colheitas na sede de freguesia e os outros em Monsanto, São Miguel D'Acha, Ninho do Açor, Proença-a-Velha, Aldeia de Santa Margarida, Zebreira, Rosmaninhal, Medelim e Ladoeiro. Em Oleiros, existem 3 postos de colheitas na freguesia de Orvalho (Casa da Zebreira, Foz do Giraldo e Orvalho), um na freguesia de Sarnadas de São Simão, Isna, Estreito e na sede do município, Oleiros. Vila de Rei possui 3 freguesias e todas elas possuem um posto de colheita do laboratório. Em Vila Velha de Rodão, existe um único posto de colheitas na sede de município e outro na freguesia de Sarnadas de Rodão. No concelho da Sertã, existem dois, um em Cernache do Bonjardim, uma freguesia do concelho e o outro na sede do concelho. Já no concelho de Proença-a-Nova, existe um na sede do concelho e outros nas freguesias de Sobreira Formosa, Montes da Senhora, São Pedro do Esteval e Alvito da Beira, sendo que nesta última existe outro posto de colheita na aldeia de Sobrainho dos Gaios. Em Penamacor, os postos de colheitas situavam-se em Águas, Aldeia de João Pires, Aldeia do Bispo, Aranhas, Benquerença, Meimoa, Pedrógão de São Pedro, Salvador e Vale Senhora da Póvoa, não existindo nenhum na sede do município, Penamacor (informação detalhada em anexos).

Em 2011, os postos de colheita do laboratório B abrangiam os distritos de Coimbra e Castelo Branco. No distrito de Coimbra, o único concelho a ser amostrado é Pampilhosa da Serra onde existem postos de colheita tanto na sede de concelho como em duas freguesias, Unhais-o-Velho e Dornelas do Zêzere. No distrito de Castelo

Branco, este laboratório apresenta uma grande sobreposição de postos de colheitas com o laboratório A. No concelho de Castelo Branco, apresenta dois postos na cidade, embora em zonas opostas. Também possui postos em Alcains, Escalos de Baixo, Monforte da Beira, Malpica do Tejo e Lourçal do Campo. No Fundão, os postos de colheita situam-se em várias freguesias do concelho: Atalaia do Campo, Alpedrinha, Barroca, Castelo Novo, Póvoa da Atalaia e Soalheira. No concelho de Proença-a-Nova, os postos de colheita, para além de se situar um na sede de município, situam-se ainda outros nas freguesias de Sobreira Formosa, São Pedro do Esteval, Peral e Montes da Senhora. No concelho de Vila Velha de Ródão, existem postos na freguesia de Perais e Fratel; na freguesia de Vila Velha de Ródão, apresentam dois, um situado na sede da freguesia e outro na aldeia de Alvaiade. A Celtejo é uma empresa situada no concelho de Vila Velha de Ródão mas é também um posto de colheitas deste laboratório, onde regularmente se fazem análises de rotina. No concelho de Idanha-a-Nova, as freguesias de Salvaterra do Extremo, Penha Garcia, Monfortinho e Termas de Monfortinho, Idanha-a-Nova, Toulões, Ladoeiro e Proença-a-Velha englobam postos de colheitas. No concelho de Oleiros, os postos de colheitas situam-se em Cambas e na sede do concelho, Oleiros. O concelho da Sertã apresenta um único posto de colheitas (informação detalhada em anexos).

Em todos os locais acima referidos, a população total abrangida por este estudo, segundo fonte do Instituto Nacional de Estatística (INE) é de 168331 pessoas. Quanto à diferença entre géneros, existem 80301 (48%) Homens e 87990 (52%) Mulheres. A área total abrangida por este estudo é de 7260,91 Km<sup>2</sup>. (11)

Na área de estudo existem ainda diversas estruturas que dão apoio à população idosa como lares de idosos, centros de dia e noite, residências e centros de convívio. O concelho de Castelo Branco é o que apresenta o maior número de instituições com 12 lares para idosos, seguido dos concelhos de Fundão com 8, Mação com 7, Idanha-a-Nova e Vila Velha de Ródão com 6 lares de idosos, Abrantes possui 5, Vila de Rei, Proença-a-Nova e Oleiros com 4 lares, seguido de Sertã, Penamacor e Sardoal com 3, 2 e 1 respetivamente. No concelho de Pampilhosa da Serra, existem 2 lares de idosos (12). Outros locais de apoio à população são as unidades de cuidados continuados: existem 4 na área do estudo - situam-se em Cernache do Bonjardim (Concelho da Sertã), Vila de Rei, Idanha-a-Nova e na freguesia de Orvalho (Concelho de Oleiros) (13). Tanto os lares de idosos quanto as unidades de cuidados continuados merecem especial atenção, uma vez que são locais onde se realizam colheitas por parte dos laboratórios, ainda assim, e por impossibilidade logística, não é possível aceder a



todos os lares de idosos da área em estudo. Quanto às 4 unidades de cuidados continuados presentes no estudo, são realizadas análises periodicamente quando são necessárias ou quando há informação por parte da instituição para tal.

Existem dois hospitais públicos presentes na área de estudo (em Castelo Branco e Abrantes) e nenhum hospital privado. Existe também um centro hospitalar localizado no Fundão que é parte integrante do Centro Hospitalar Cova da Beira. Existem ainda espalhados pela zona de estudo 15 centros de saúde, 137 extensões de saúde e 67 farmácias em 2011 (14).

## **Metodologia**

### **Laboratorial**

#### **Laboratório A**

No laboratório A, as amostras de urina chegam vindas de todos os postos de colheita situados na região, sendo colhidas pela manhã e analisadas durante a tarde. Tanto as urinas do tipo II como as urinas colhidas aseticamente para análise bacteriológica são triadas ao fim da manhã e separadas para as respetivas análises, sendo realizadas paralelamente no laboratório de microbiologia. As urinas asséticas são levadas para a câmara de fluxo laminar onde são semeadas em meio cromogénico CPS, com uma ansa descartável calibrada de 10µl. A sementeira é realizada pela técnica do riscado, sendo feitas duas por placa. Após a sementeira, os meios vão para a estufa à temperatura de 37 graus onde são incubados durante a noite (12h), sendo visualizados no próximo dia com auxílio do resultado do sedimento urinário. Quando o crescimento bacteriano é superior a  $10^5$  ufc/ml, é sinónimo de infeção urinária e, consequentemente, faz-se TSA por método de difusão em agar em meio Muller Hinton. Para análise da resistência aos antibióticos a cultura tem de ser pura, para isso recolhe-se com uma ansa uma colónia isolada e suspende-se em solução salina 3 ml, de forma a apresentar uma turvação entre 0,55 e 0,65 Mcfarland.

Se a cultura for mista, isto é, se apresentar unidades formadoras de colónia diferentes na mesma proporção e um sedimento urinário considerável (possuir muitos piócitos, leucócitos e células de descamação do trato urinário), é considerada como infeção urinária causada por dois agentes bacterianos, pelo(s) especialista(s) em análises clínicas do laboratório. Neste caso, repicam-se as unidades formadoras de colónia predominantes para se obter uma cultura pura e faz-se o TSA paralelamente.

Com auxílio de um *dispenser* são colocados aleatoriamente os antibióticos nas placas, são utilizados grupos ou famílias de antibióticos diferentes no TSA, dependendo do produto a analisar (ferida, urina ou expetoração)

Em 2011, na análise bacteriológica de urina, os antibióticos não foram utilizados sempre de forma regular, certos antibióticos foram introduzidos no decorrer do ano e outros foram utilizados muito pontualmente em breves períodos de tempo. A utilização de antibióticos antibacterianos é distinta, caso se trate de bactérias Gram negativas e de bactérias Gram positivas. De um modo geral, antibióticos como a Amoxicilina, Amoxicilina mais Ácido Clavulânico, Nitrofurantoína, Trimetoprim/Sulfametoxazol, a Cefotaxima, Norfloxacin e a Ceftazidima foram utilizados para bactérias Gram negativas e Gram positivas durante todo o ano. Os antibacterianos Ofloxacin e Netilmicin foram somente utilizados até Maio, altura em que se introduziu o uso da Ciprofloxacina. Também utilizados nos TSA de bactérias Gram negativas se encontram antibacterianos como a Fosfomicin, Clindamicin, Cefuroxim e Gentamicin. A Cefixim também foi usada, mas só em 5 TSA ao longo do ano.

Em Gram positivas, Eritromicin, Gentamicin e Cefixim foram utilizadas muito pontualmente, enquanto que a Tetraciclina foi utilizada entre Agosto e Dezembro.

O laboratório A dispõe de um aparelho automático na área da microbiologia/bacteriologia, o Vitek 2 Compact. Este é utilizado normalmente em dois casos: quando há um isolado bacteriano que não possui uma morfologia típica conhecida e quando é dúbia a sua identificação. Também quando uma bactéria é muito resistente aos antibióticos usados em rotina, a sua introdução no aparelho permite não só uma grande variedade na escolha de antibióticos a estudar como também a deteção de vários mecanismos de resistência por parte das bactérias, automaticamente.

### **Laboratório B**

No laboratório B, as urinas passam pelo mesmo processo de recolha e triagem que no laboratório A, fazendo-se posteriormente o sedimento urinário.

Se na análise de sedimento urinário não apresentar leucócitos, coloca-se 10µl com uma ansa descartável calibrada no meio CLED, o resultado é negativo quando não ocorre crescimento bacteriano ou positivo quando se observa a presença de crescimento. Neste caso, faz-se uma repetição do sedimento e/ou uma nova colheita

da amostra, sendo a principal hipótese para tal crescimento uma conservação deficiente. Por outro lado, se a análise ao sedimento urinário apresentar leucócitos, coloca-se 10 µl de urina no meio CPS. O resultado do crescimento bacteriano neste meio vai influenciar as escolhas/passos seguintes: se for um bacilo Gram – é colocado na galeria ID 32 E do mini api onde depois é incubado durante 24h. Simultaneamente, coloca-se em ATBUR para se saber a sensibilidade aos antibióticos da bactéria em questão. Se a placa apresentar colónias azuis pequena, trata-se de cocos Gram + e, portanto, a bactéria é considerada *Enterococcus faecalis*. Quando são detetados cocos Gram + e potencialmente *Staphylococcus aureus* faz-se uma prova para confirmar essa presença. O teste do látex é utilizado para essa deteção, uma vez que deteta um *cumpling factor* e a proteína A presentes na parede bacteriana do *Staphylococcus aureus*. Noutros casos em que há infeções por *Staphylococcus spp*, utiliza-se o Api Staph para detetar qual a espécie presente e assim diferenciar as diferentes espécies. O antibiograma para o género *Staphylococcus spp* é ATB Staph. A presença de *Pseudomonas aeruginosa* é identificável pelo brilho metálico, com colónias achatadas e castanhas apresentando um cheiro característico a jasmim em CPS, além disso, apresentam uma cor esverdeada no meio Muller Hinton. O antibiograma feito para a *Pseudomonas aeruginosa* é também ele específico para esta bactéria, é utilizado o ATB Pse uma vez que possui uma gama de antibióticos dirigidos para esta bactéria que normalmente apresenta um grande número de resistências aos antibióticos. Todas as bactérias que apresentem um quadro de multirresistência são colocadas em ATB Pse, uma vez que os antibióticos usados são bastante diferentes e mais diversificados.

De um modo geral, os antibióticos antibacterianos mais usados por este laboratório incluem a Amoxicilina, Amoxicilina mais Ácido Clavulânico, Nitrofurantoína, Norfloxacin, Ciprofloxacina, Ceflaxor, Trimetoprim/Sulfametoxazol, Ceftriaxone e Cefuroxima, tanto para as bactérias Gram positivas como para Gram negativas. Certos antibióticos eram utilizados menos frequentemente, devido á multirresistência apresentada pela bactéria ou pela espécie de bactéria isolada, estes incluem a Amicacina, Ceftazidima, Tobramicina, Cefalotina, Gentamicina, Piperacilina, Netilmicina, Cefotaxima, Ampicilina, Cefotaxima, Fosfomicina, Cefepima, Levofloxacin. Utilizava-se os carbapenemos (Imipenem e Meropenem) em casos de multirresistência.

Em 2011, este laboratório não apresentava Vitek 2 Compact, portanto todos os casos de multirresistência eram introduzidos no ATB Pse.

## Princípio de Identificação das colónias em CPS

Como referido, ambos os laboratórios semeiam a urina para análise bacteriológica em meio cromogénico CPS. O meio CPS permite uma identificação eficiente e rápida dos principais agentes patogénicos responsáveis pela infeção urinária: *E.coli*, *Enterococcus spp*, *Proteus spp* e KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*), para além de permitir a identificação de isolados também consegue detetar várias bactérias de géneros diferentes numa mistura microbiana como é exemplo a mistura entre *E.coli*, *Proteus spp* e *Enterococcus spp*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*, *E.coli* e *Proteus mirabilis* e também a mistura entre *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis*, isto devido á diferente coloração obtida pelas várias unidades formadoras de colónias.

As colónias apresentando variações entre cor-de-rosa e o vermelho escuro são identificadas como *E.coli* devido à utilização de substratos específicos (Beta-glucuronidase + e Beta-glucosidase) que lhe confere a cor rosa. As colónias beges com um halo castanho resultam da não produção de Beta-glucuronidase e Beta-glucosidase e produção de desaminase, e por isso são pertencentes ao género *Proteus spp*. *Enterococcus spp* apresentam colónias de pequena dimensão (muito inferior às colónias de *E.coli* e *Proteus spp*) e apresentam uma tonalidade de verde-turquesa, uma vez que são Beta-glucuronidase - e Beta-glucosidase +. As colónias de KESC apresentam uma variação entre o verde-azulado até ao cinzento-azulado devido à Beta-glucosidase + e a sua dimensão é muito semelhante a colónias de *E.coli* e *Proteus spp*. Menos frequentes, mas identificáveis no laboratório é a *Pseudomonas aeruginosa* que apresenta colónias amarelas podendo ser pigmentadas ou não. O *Staphylococcus aureus* apresenta normalmente colónias amarelas e de dimensão inferior às de *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto, nem sempre a sua distinção é evidente e objetiva, sendo necessário recorrer a outras formas de comprovar a identificação como uma repicagem para o meio de manitol ou então, proceder ao teste da coagulase que dá positivo caso se tratasse de *Staphylococcus aureus*, isto no laboratório A, pois no laboratório B utilizam o teste do latex.

Quando se suspeita de *Pseudomonas aeruginosa*, faz-se nova repicagem para o meio de CPS para tentar obter uma cultura pura. No laboratório A, introduz-se, posteriormente no Vitek 2 Compact com a sua respetiva carta de antibiograma e identificação. No laboratório B, introduz-se no ATB Pse.

Tanto o *Staphylococcus aureus* como o *Staphylococcus saprophyticus* apresentam colónias muito pequenas, a sua principal distinção é a coloração das suas colónias, enquanto o *Staphylococcus saprophyticus* possui colónias cor-de-rosa opacas e brilhantes, o *Staphylococcus aureus* apresenta colónias amarelas. O *Streptococcus agalactiae* apresenta colónias que normalmente são violeta e a sua dimensão é muito reduzida, semelhantes a colónias de *Staphylococcus spp.*

A distinção entre colónias de *Citrobacter freundii* e de *Klebsiella spp* também é particularmente difícil, uma vez que as colónias em CPS apresentam a mesma tonalidade e dimensão. Contudo, as colónias de *Klebsiella spp* tendem a ser mais verdes que as de *Citrobacter freundii* que são mais cinzentas. No laboratório A, se tal dúvida persistir, introduz-se no Vitek 2 Compact e no laboratório B utiliza-se o ID 32 E. No laboratório A, todos os casos de isolamentos de colónias de bactérias que são diferentes das morfologias típicas acima referidas são introduzidas no Vitek 2 Compact com a respetiva identificação; já no laboratório B, são colocados no ID 32 E que permite a identificação até à espécie. Embora ambos os laboratórios utilizem o meio CPS para identificar bactérias, o laboratório A indica muito frequentemente o resultado até ao género encontrado, exceto quando se trata de *E.coli* e *Acinetobacter baumannii*; no laboratório B, a bactéria é identificada até à espécie e só em casos de grande dificuldade em determinar a espécie se indica o género.

## Resultados e Discussão

Os dados relativos a este estudo foram extraídos a partir do *software* utilizado em cada laboratório (E-deia no laboratório A e Maxdata no laboratório B), a partir dos quais foi possível retirar a informação relativa ao objetivo do estudo.

A observação do boletim de análises de cada paciente tornou possível a obtenção de todos os dados clínicos resultantes das análises requeridas pelo clínico. No entanto, somente as análises de urina colhida aseticamente para análise bacteriológica (Isolamento de microrganismos, quantificação do número de colónias (superior a  $10^5$  ufc (unidades formadoras de colónias)/ml) e TSA) serão utilizadas neste estudo. O sexo/género do paciente e o posto de colheitas também são utilizados, o primeiro para distinguir a prevalência da infeção entre géneros e a segunda para averiguar a relação entre bactérias multirresistentes e o posto de colheitas (utilizada somente no laboratório A).

No estudo de resistência aos antibióticos, foram observados todos os testes de sensibilidade aos antibacterianos correspondentes aos microrganismos isolados em ambos os laboratórios, durante o ano de 2011.

Ambos os laboratórios de análises clínicas seguem os critérios utilizados pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) que servem como base para interpretação dos testes de sensibilidade aos antibióticos.

### Prevalência de ITU

Durante o ano de 2011, foram requeridas 10061 análises bacteriológicas de urina na zona em estudo, das quais foram identificados 2054 isolamentos de microrganismos provenientes das amostras em ambos os laboratórios. Ou seja, apenas 20% demonstrou um crescimento bacteriano significativo em meio de cultura sendo sinónimo de infeção do trato urinário.

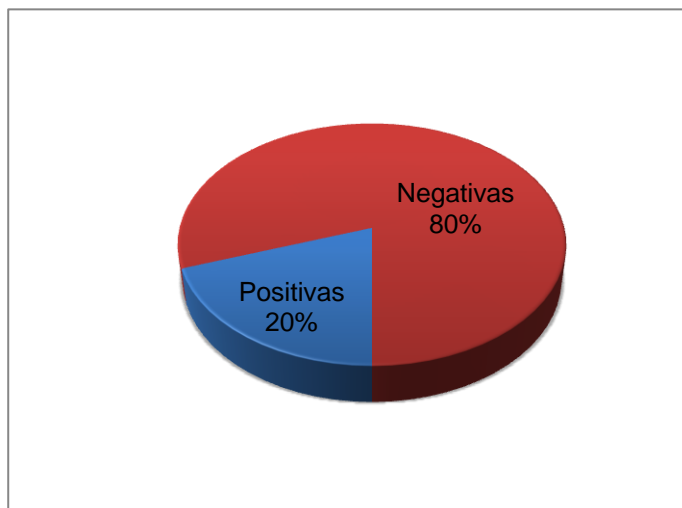


Gráfico 1 - Prevalência de ITU na zona de estudo

Tendo em conta que a prevalência de ITU não é homogênea (não afeta de igual modo ou nas mesmas proporções) em relação ao género, este fator também foi tido em conta. O gráfico 2 pretende demonstrar essa discrepância, que foi também verificada no estudo.

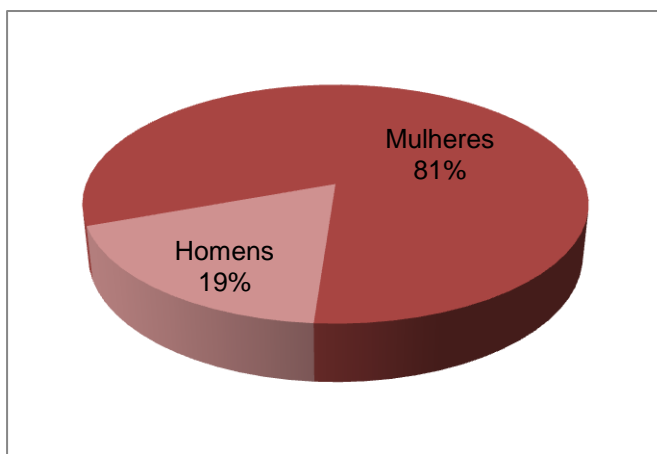


Gráfico 2 - Prevalência de ITU na zona de estudo por género

De acordo com este estudo, foram identificados 1660 organismos provenientes de urinas de indivíduos do sexo feminino (81%) e 394 do sexo masculino (19%).

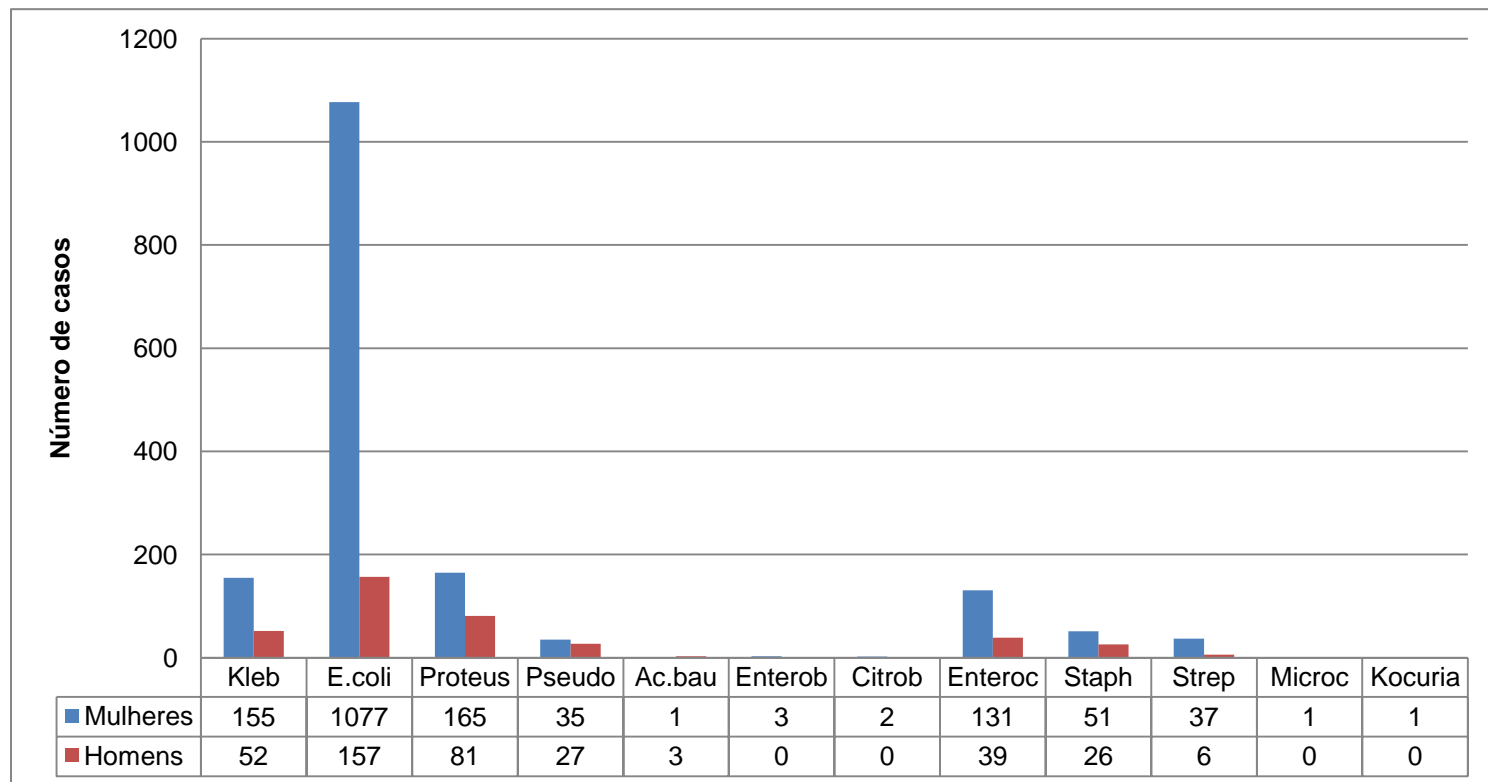
O isolamento bacteriano em ambos os laboratórios não foi semelhante, e devido à metodologia utilizada não foi possível uniformizar todos os dados recolhidos numa única tabela. Sendo assim, estabeleceu-se que todos os

microrganismos fossem descritos até ao género e não à espécie, os únicos organismos em que se identifica a espécie é a *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*, uma vez que os meios de crescimento utilizados pelos laboratórios permitem uma deteção muito fiável (no caso da *E.coli*). A identificação de *Acinetobacter baumannii* só foi possível através da análise pelo Vitek 2 Compact.

Na prática clínica nem sempre é isolado um único microrganismo responsável pela infeção. Ao longo deste estudo foram descritas vários casos em que se isolaram dois agentes bacterianos, esses casos irão ser analisados com mais atenção no capítulo específico.

As bactérias multirresistentes também são uma constante numa urocultura, devido à resistência aos antibióticos usados na rotina laboratorial são introduzidas em equipamentos automatizados que permitem selecionar um maior conjunto de antibióticos, como é o caso do Vitek 2 Compact.

O gráfico 3 representa a prevalência de bactérias isoladas das uroculturas durante o ano de 2011. Indica também a relação da infeção entre o género masculino e feminino.



**Gráfico 3 - Prevalência de bactérias responsáveis por ITU na zona de estudo**

**Legenda:** Kleb – *Klebsiella spp*, E.coli – *Escherichia coli*, Pseudo – *Pseudomonas spp*, Ac.bau – *Acinetobacter baumannii*, Enterob – *Enterobacter spp*, Citrob – *Citrobacter spp*, Enteroc – *Enterococcus spp*, Staph – *Staphylococcus spp*, Strep – *Streptococcus spp*, Microc – *Micrococcus spp*, Kocuria – *Kocuria spp*.

Este estudo demonstra que *Escherichia coli* é a bactéria mais frequentemente isolada quando há queixas ou sintomas de ITU tanto em homens como mulheres. O que também é evidenciado por outros estudos do género (10, 15, 16, 17) especialmente em países europeus.

*Proteus spp* (12%) surge em segundo lugar, como sendo a bactéria responsável por grande parte das ITU seguido de *Klebsiella spp* (10%). No entanto, a infeção causada por *Proteus spp*, quando comparada com a infeção causada por *E.coli*, é muito mais severa e está associada com uma maior incidência de pielonefrite (18). Cuevas<sup>7</sup> e Schito<sup>15</sup> em estudos similares indicam que a presença de *Klebsiella spp* é prevalente em relação a *Proteus spp*.

*Enterococcus spp* também apresenta uma prevalência relevante, sendo a quarta mais predominante e a mais prevalente Gram positiva. Khalmeter<sup>10</sup> em 2003 não evidenciava uma prevalência tão grande em relação a esta bactéria.

É evidente que as mulheres são as mais afetadas em casos de ITU superando em todos os casos de isolamento os homens, isso só não acontece no caso particular de infeção por *Acinetobacter baumannii* em que a infeção no homem é superior á infeção na mulher.

No sexo feminino, surge também uma maior diversidade de bactérias isoladas, quer em bactérias Gram negativas, quer em Gram positivas.

As infeções por bactérias Gram negativas são prevalentes e em maior quantidade que as Gram positivas, no entanto *Enterococcus spp* é a bactéria Gram positiva com maior prevalência (entre as bactérias Gram positivas) com resultados muito semelhantes a *Klebsiella spp* (bactéria Gram negativa) nas mulheres.

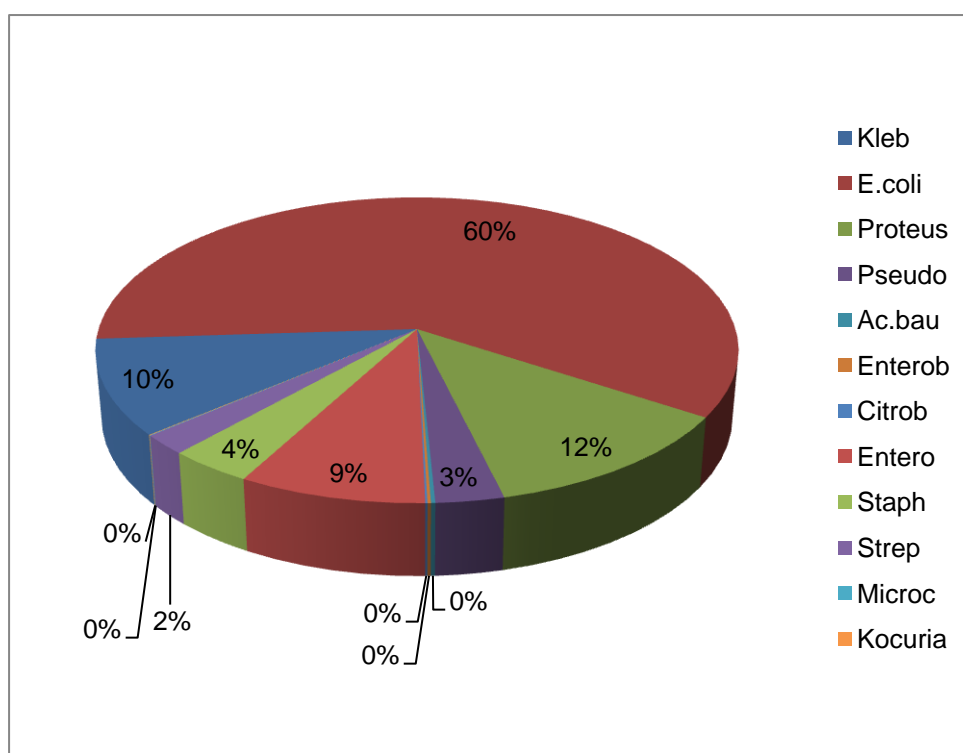
O género *Pseudomonas spp* apresenta resultados muito semelhantes (muito aproximados) entre homens e mulheres, no entanto não apresenta uma prevalência muito acentuada na população em estudo, uma vez que o principal problema desta bactéria é a grande quantidade de resistências que apresenta aos antibióticos.

Surgem também bactérias que são isoladas com alguma raridade e que também causam ITU na comunidade, entre as quais se pode destacar infeções por *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter spp* e *Citrobacter spp* pelas Gram negativas e *Micrococcus spp* e *Kocuria spp* nas Gram positivas.



Especial atenção recai sobre a espécie *Acinetobacter baumannii*, uma bactéria que não é normalmente isolada e encontrada na comunidade e que apresenta grande resistência aos antibióticos, principalmente  $\beta$ -lactâmicos (19). São encontrados essencialmente em pacientes hospitalizados, particularmente nos de estado crítico. São características específicas para uma infecção por *A. baumannii*, pacientes idosos, presença de doenças subjacentes graves, supressão do sistema imune, traumatismo ou queimaduras, realização de procedimentos invasivos, bem como algaliação, suporte com ventilação mecânica, hospitalização prolongada e administração prévia de antibióticos. Esta infecção, que também pode ocorrer na comunidade, embora com menos frequência, é evidenciada principalmente no sudeste asiático e na Austrália tropical (20) sendo a pneumonia a principal manifestação clínica seguido da bacteremia (21).

O gráfico 4 sugere a predominância das bactérias isoladas nas análises bacteriológicas de urina.



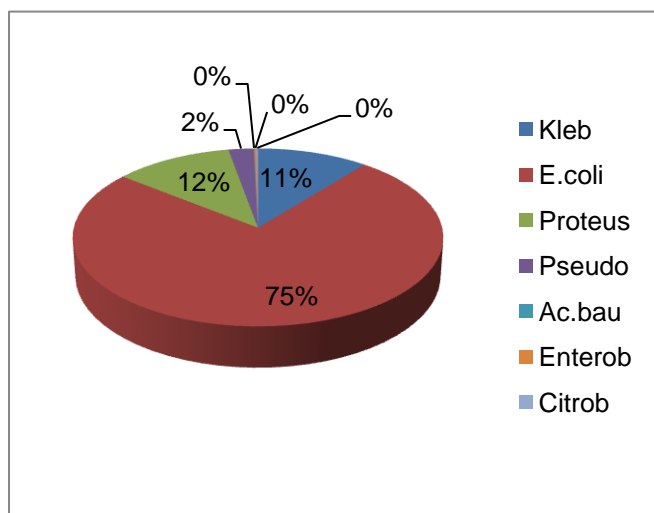
**Gráfico 4 - Prevalência total das bactérias isoladas em ambos os gêneros**

**Legenda:** Kleb – *Klebsiella spp*, E.coli – *Escherichia coli*, Pseudo – *Pseudomonas spp*, Ac.bau – *Acinetobacter baumannii*, Enterob – *Enterobacter spp*, Citrob – *Citrobacter spp*, Enteroc – *Enterococcus spp*, Staph – *Staphylococcus spp*, Strep – *Streptococcus spp*, Microc – *Micrococcus spp*, Kocuria – *Kocuria spp*.

A expressão de bactérias Gram positivas na população não é muito ativa, apenas 15 % destas bactérias são isoladas como responsáveis de ITU.

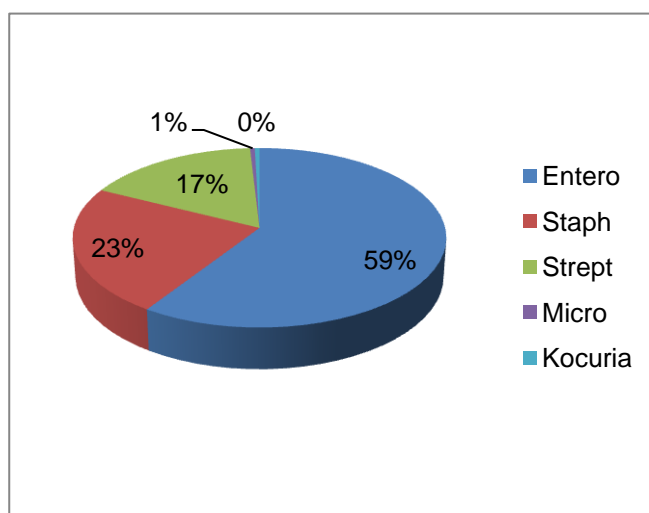
A distribuição de bactérias consoante o sexo é diferente. Os gráficos 5 e 6 permitem estabelecer a prevalência nas mulheres, enquanto que os gráficos 7 e 8 indicam a prevalência nos homens.

Nas mulheres:



**Gráfico 5 - Distribuição de bactérias Gram - nas mulheres**

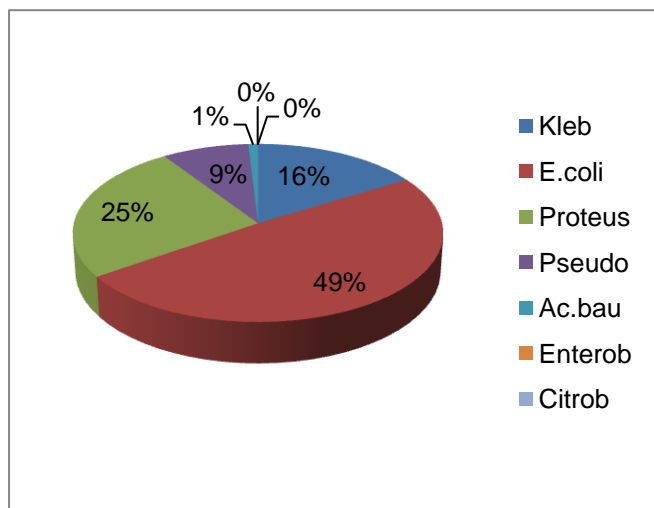
**Legenda:** Kleb – *Klebsiella spp.*, E.coli – *Escherichia coli*, Pseudo – *Pseudomonas spp.*, Ac.bau – *Acinetobacter baumannii*, Enterob – *Enterobacter spp.*, Citrob – *Citrobacter spp.*



**Gráfico 6 - Distribuição de bactérias Gram + nas mulheres**

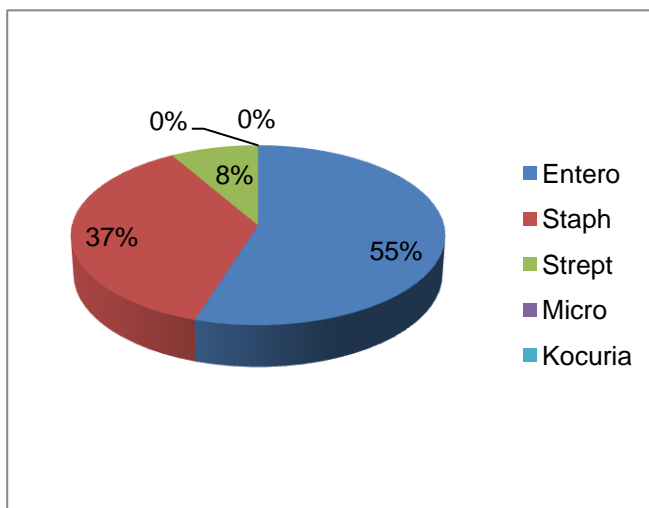
**Legenda:** Enteroc – *Enterococcus spp.*, Staph – *Staphylococcus spp.*, Strep – *Streptococcus spp.*, Microc – *Micrococcus spp.*, Kocuria – *Kocuria spp.*

Nos homens:



**Gráfico 7 - Distribuição de bactérias Gram - nos homens**

**Legenda:** Kleb – *Klebsiella spp.*, E.coli – *Escherichia coli*, Pseudo – *Pseudomonas spp.*, Ac.bau – *Acinetobacter baumannii*, Enterob – *Enterobacter spp.*, Citrob – *Citrobacter spp.*



**Gráfico 8 - Distribuição de bactérias Gram + nos homens**

**Legenda:** Enteroc – *Enterococcus spp.*, Staph – *Staphylococcus spp.*, Strep – *Streptococcus spp.*, Microc – *Micrococcus spp.*, Kocuria – *Kocuria spp.*

Quando comparados isoladamente, a prevalência de bactérias consoante o género é diferente. A prevalência da infeção por bactérias Gram negativas nos homens é mais heterogéneo quando comparado com as mulheres, em que existe uma única bactéria predominante, a *E.coli*. A distribuição de bactérias Gram positivas em ambos os sexos é mais semelhante uma vez que o género *Enterococcus spp* afeta de modo semelhante homens e mulheres, no entanto, *Staphylococcus spp* é mais predominante nos homens e o *Streptococcus spp* nas mulheres.

### **Resistência aos antibióticos**

No período de tempo em que o estudo foi realizado, foram obtidos 2054 isolados bacterianos responsáveis por ITU. Como tal, o procedimento estipula que, depois de se obter uma cultura pura, se efetue o TSA para o clínico indicar a toma de um determinado antibiótico para a recuperação do paciente.

Este capítulo irá abordar o perfil de resistências das bactérias isoladas no estudo, no entanto, a escolha de antibióticos antibacterianos a ser usados nos TSA não foram semelhantes em ambos os laboratórios.

Assim, o estudo de resistência aos antibacterianos só vai ser realizado nas famílias de penicilinas (Amoxicilina e Amoxicilina mais Ácido Clavulânico), Nitrofuranos (Nitrofurantoína), Quinolonas (Norfloxacin e Ciprofloxacina) e a associação entre o Trimetoprim/Sulfametoxazol, uma vez que foram os mais utilizados por ambos os laboratórios.

Os dados relativos às resistências demonstradas pelas bactérias encontram-se nas seguintes tabelas, onde indicam a percentagem de resistência dos isolados. No entanto, para uma melhor perceção da temática pode consultar as tabelas gerais que se encontram em anexo, onde indicam a percentagem de suscetibilidade e a percentagem de isolados onde não foi possível obter resultados.

**Tabela 1 – Percentagens de resistência de bactérias Gram negativas isoladas em mulheres**

<b>Antibiótico</b>	<b>Kleb</b>	<b>E.coli</b>	<b>Proteus</b>	<b>Pseudo</b>	<b>Ac.bau</b>	<b>Enterob</b>	<b>Citro</b>
	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>
Amoxicilina	83%	43%	39%	57%	100%	100%	0%
Amox+Ac.Clav.	13%	2%	13%	66%	100%	67%	50%
Nitrofurantoína	27%	3%	76%	54%	100%	67%	50%
Norfloxacina	16%	19%	11%	26%	0%	0%	0%
Ciprofloxacina	16%	14%	11%	26%	0%	0%	0%
Trim/Sul	19%	26%	25%	71%	100%	0%	0%

**Legenda:** Kleb – *Klebsiella spp*, E.coli – *Escherichia coli*, Proteus – *Proteus spp*, Pseudo – *Pseudomonas spp*, Ac.bau – *Acinetobacter baumannii*, Enterob – *Enterobacter spp*, Citro – *Citrobacter spp*, Res – Resistência, Amox+Ac.Clav – Amoxicilina mais Ácido Clavulânico, Trim/Sul – Trimetoprim/Sulfametoxazol

Tendo em conta a tabela 1, o género *Pseudomonas spp* é aquele que mais percentagem de resistência possui relativamente a todas as famílias de antibióticos, sendo a percentagem mais elevada na associação Trimetoprim/Sulfametoxazol. Podemos afirmar que é o género mais preocupante a nível da comunidade em estudo, pois os níveis de resistência são relativamente altos quando comparados com outras bactérias.

A bactéria *E.coli*, embora sendo o microrganismo mais isolado em colheitas de urina para análise bacteriológica, não apresenta grandes percentagens de resistência face aos antibacterianos, sendo ainda muito sensível à Nitrofurantoína e à associação de Amoxicilina com Ácido Clavulânico, na zona do estudo.

Relativamente ao género *Enterobacter spp*, apresenta ainda uma fraca resistência relativamente às Quinolonas, assim como o *Acinetobacter baumannii*. Já o género *Citrobacter spp*, pouco isolado em uroculturas, não apresenta grandes resistências.

**Tabela 2 – Percentagens de resistência de bactérias Gram negativas isoladas em homens**

<b>Antibiótico</b>	<b>Kleb</b>	<b>E.coli</b>	<b>Proteus</b>	<b>Pseudo</b>	<b>Ac.bau</b>
	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>
Amoxicilina	77%	49%	48%	59%	100%
Amox+Ac.Cla	27%	4%	33%	74%	100%
Nitrofurantoína	38%	6%	73%	56%	100%
Norfloxacina	27%	37%	32%	29%	100%
Ciprofloxacina	27%	27%	26%	33%	100%
Trim/Sul	29%	34%	30%	70%	67%

**Legenda:** Kleb – *Klebsiella spp*, E.coli – *Escherichia coli*, Proteus – *Proteus spp*, Pseudo – *Pseudomonas spp*, Ac.bau – *Acinetobacter baumannii*, Res – Resistência, Amox+Ac.Clav – Amoxicilina mais Ácido Clavulânico, Trim/Sul – Trimetoprim/Sulfametoxazol

Nos homens, para além de haver menos bactérias isoladas, o *Acinetobacter baumannii* apresenta um quadro de resistência muito severo em todas as famílias de antibacterianos estudados, exceto na associação de Trim/Sulfa em que o género *Pseudomonas spp* o supera (tabela 2).

Antibióticos como as Quinolonas, embora possuindo uma percentagem de resistência significativa, são as mais indicadas para a generalidade de bactérias isoladas. A associação de Amoxicilina com Ácido Clavulânico e Nitrofurantoína parecem surtir efeito no tratamento de ITU na zona em estudo, em casos de *E.coli*.

**Tabela 3 – Percentagens de resistência de bactérias Gram positivas isoladas em mulheres**

<b>Antibiótico</b>	<b>Entero</b>	<b>Staph</b>	<b>Strept</b>	<b>Micro</b>	<b>Kocuria</b>
	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>
Amoxicilina	5%	12%	5%	0%	0%
Amox+Ac.Cla	2%	0%	3%	0%	0%
Nitrofurantoína	4%	6%	3%	0%	0%
Norfloxacin	18%	35%	27%	100%	0%
Ciprofloxacina	8%	14%	11%	0%	0%
Trim/Sul	18%	18%	40%	0%	0%

**Legenda:** Entero – *Enterococcus spp*, Staph – *Staphylococcus spp*, Strep – *Streptococcus spp*, Micro – *Micrococcus spp*, Kocuria – *Kocuria spp*, Res – Resistência, Amox+Ac.Clav – Amoxicilina mais Ácido Clavulânico, Trim/Sul – Trimetoprim/Sulfametoxazol

Quanto ao perfil de resistências de bactérias Gram positivas em mulheres (tabela 3), pode notar-se que são pouco resistentes aos antibióticos de um modo geral. No entanto, a Norfloxacin e a associação de Trim/Sulfa não são eficientes no tratamento de ITU nesta região, pois apresentam uma percentagem de resistência superior a todos os outros antibióticos em estudo.

**Tabela 4 – Percentagens de resistência de bactérias Gram positivas isoladas em homens**

<b>Antibiótico</b>	<b>Entero</b>	<b>Staph</b>	<b>Strep</b>
	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>
Amoxicilina	10%	27%	0%
Amox+Ac.Cla	5%	19%	0%
Nitrofurantoína	8%	12%	0%
Norfloxacin	46%	54%	33%
Ciprofloxacina	33%	46%	0%
Trim/Sul	26%	15%	33%

**Legenda:** Entero – *Enterococcus spp*, Staph – *Staphylococcus spp*, Strep – *Streptococcus spp*, Res – Resistência, Amox+Ac.Clav – Amoxicilina mais Ácido Clavulânico, Trim/Sul – Trimetoprim/Sulfametoxazol

Nos homens, os antibióticos estudados para tratar ITU causadas por bactérias Gram positivas (tabela 4) são menos eficientes, visto a sua percentagem de resistência ser superior quando comparada com a das mulheres. É caso de exceção o género *Streptococcus spp.*

Nitrofurantoína e a associação de Amoxicilina com Ácido Clavulânico são os antibióticos antibacterianos que devem ser considerados mais eficientes no tratamento de ITU por bactérias Gram positivas.

### **Urinas em que foram isolados dois agentes bacterianos**

Na prática clínica, nem sempre um único microrganismo é isolado de uma urocultura ou de qualquer outro produto usado para verificar a existência de microrganismos patogénicos. Estes casos, em que existe uma combinação entre vírus, bactérias, fungos e parasitas, denominam-se doenças polimicrobianas ou simplesmente coinfeções. Estas infeções resultam de uma grande variedade de casos que podem levar à presença de dois ou mais microrganismos: a presença de um microrganismo pode provocar um nicho, levando à colonização por outro microrganismo patogénico, um microrganismo predispunha o hospedeiro para a colonização por outros microrganismos e também existem casos em que microrganismos que não são patogénicos causem, juntos, doença no hospedeiro (22).

As coinfeções surgem, principalmente, associadas ao degradar do estado de saúde humana e de infeções que se tornam graves (exacerbadas). Embora existam coinfeções entre vários organismos patogénicos, são as bactérias as principais responsáveis por este tipo de infeção (23).

Este capítulo irá abordar todos os casos em que houve o isolamento de dois agentes bacterianos (Coinfeção/Infeção mista) em ambos os laboratórios. São os (vários) especialistas em análises clínicas dos laboratórios que validam e determinam esse resultado, para isso, baseiam-se na semelhança do crescimento proporcional das bactérias predominantes no meio de cultura e na análise do sedimento urinário realizado previamente.

Assim, durante o período de tempo em que o estudo ocorreu, foram identificadas 28 casos no laboratório A e 4 casos no laboratório B, resultando num total de 32.

O género feminino é também aqui o mais afetado com 25 casos, enquanto que o género masculino apresenta somente 7.

Em 27 casos, houve um agente que lhes é comum a todas: a *E.coli*. Em 15, houve infeção juntamente com *Klebsiella spp*, em 10 com *Proteus spp* e em 2 com a *Pseudomonas spp*.

Houve um caso com bactérias Gram positivas, *Staphylococcus spp* e *Enterococcus spp*, e com bactérias Gram positivas e Gram negativas, *Enterococcus spp* – *Pseudomonas spp* e *Enterococcus spp* – *Enterobacter spp*. Todas elas detetadas em elementos do sexo masculino.

O isolamento conjunto de *Klebsiella spp* e *Pseudomonas spp* foi detetado em apenas 2 casos e em ambos os géneros.

A grande capacidade de resistência por parte das bactérias isoladas fez com que em dois casos fossem introduzidas no equipamento automático Vitek 2 Compact, um caso entre *E.coli* e *Proteus spp* e *E.coli* e *Klebsiella spp*.

A relação entre o isolamento de dois agentes bacterianos e o mês do ano também foi evidenciado, no entanto esta relação ainda não foi estudada cientificamente. O gráfico 9 tem em conta o cenário geral em que foram obtidos esses resultados e sugere que os meses entre Agosto e Outubro apresentem uma grande quantidade infeções. Esta situação talvez ocorra devido a alterações da temperatura, gripes e infeções virais façam com que haja uma diminuição da imunidade do hospedeiro e favoreça o crescimento da flora bacteriana presente na urina, levando a infeções urinárias.

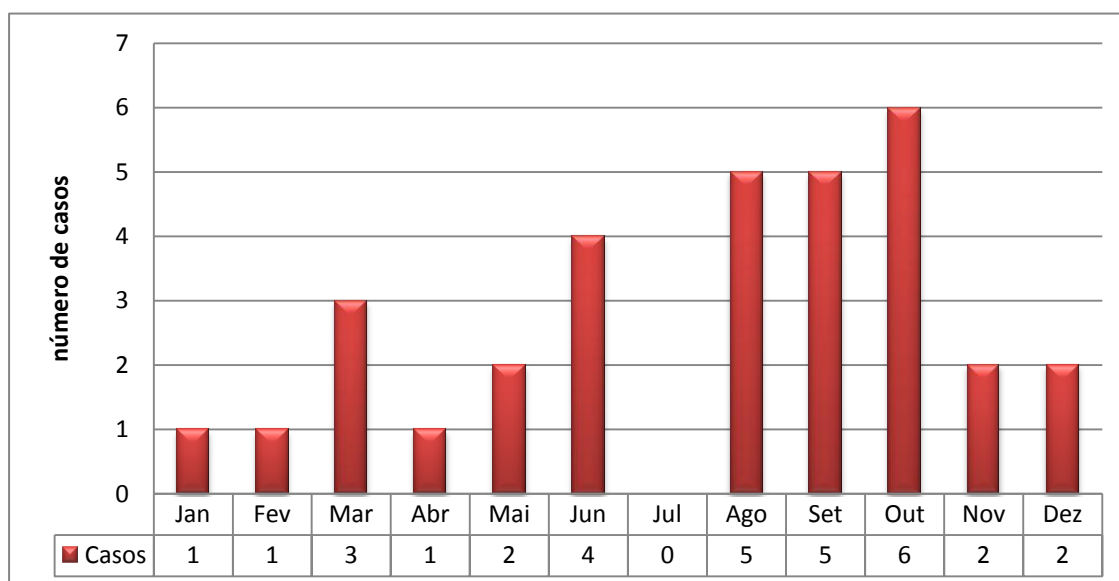


Gráfico 9 - Casos de isolamento de dois agentes bacterianos durante 2011

## **Bactérias Multirresistentes/Vitek 2 Compact**

Ao longo dos últimos anos, a comunidade científica tem alertado para uma mudança no cenário da suscetibilidade aos antibióticos que podem ter um impacto significativo no tratamento de infeções, quer em hospitais, quer na comunidade em geral (24, 25, 26).

A resistência aos antibióticos por parte de bactérias está a aumentar. Estas criaram mecanismos complexos de resistência únicos, que favoreceram uma grande variedade de espécies patogénicas a desenvolver estirpes com padrões multirresistentes (27), como as bactérias produtoras de betalactamases de espetro alargado (ESBL's), MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), KPC (*Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase), VRE (Vancomycin-resistant Enterococcus) entre outros. (28)

O aparecimento da primeira bactéria pan-resistente E.coli produtora de NDM-1 tornou claro que este é um sinal de que podemos estar a entrar numa era pós-antibiótica (8).

Na Europa, o Centro Europeu para o Controlo e Prevenção de Doenças (ECDC) anunciou, no seu primeiro relatório de doenças epidemiológicas transmissíveis, que a resistência bacteriana aos antibióticos era uma das mais importantes ameaças de doenças infecciosas na Europa, devido ao grande aumento de bactérias multirresistentes nos últimos anos que causam pelo menos 25000 mortes todos os anos (29). A Europa do Sul é claramente mais afetada que a Europa do Norte e são países como Portugal e Espanha os que mais bactérias apresentam com múltiplas resistências aos antibióticos.

O problema é de tal importância que levou a que a Organização Mundial de Saúde (OMS) escolhesse a resistência aos antibióticos como tema no Dia da Saúde Mundial – 7 de Abril de 2011. A OMS apelou a que todos os governos desenvolvessem esforços no controlo e prevenção em várias áreas, como a vigilância da resistência antibacteriana, um uso racional e adequado de antibióticos que engloba a educação dos profissionais de saúde e do público em geral, a aplicação e introdução de leis relacionada com a venda de antibióticos sem receita médica e medidas relacionadas com a prevenção e controlo da infeção, como a lavagem das mãos, principalmente nas unidades de saúde para limitar a propagação de estirpes multirresistentes (30).



A disseminação de estirpes e bactérias multirresistentes pela comunidade e ambiente hospitalar está a contribuir para uma ameaça global nos próximos anos, numa altura em que não há prespetivas para que novos antibióticos sejam desenvolvidos (27).

A definição para bactéria ou microrganismo multirresistente ainda não é muito clara e, portanto, não há uma definição universal. Existem vários conceitos para o mesmo termo, mas com conotações diferentes, dependendo se o contexto for clínico, microbiológico ou epidemiológico. De um modo geral, a definição de multirresistência deve incluir duas condições: a existência de resistência a mais de uma família ou grupo de antibióticos usados, relevância clínica e epidemiológica da resistência (possibilidade de causar surtos ou transmissão do mecanismo de resistência) (28).

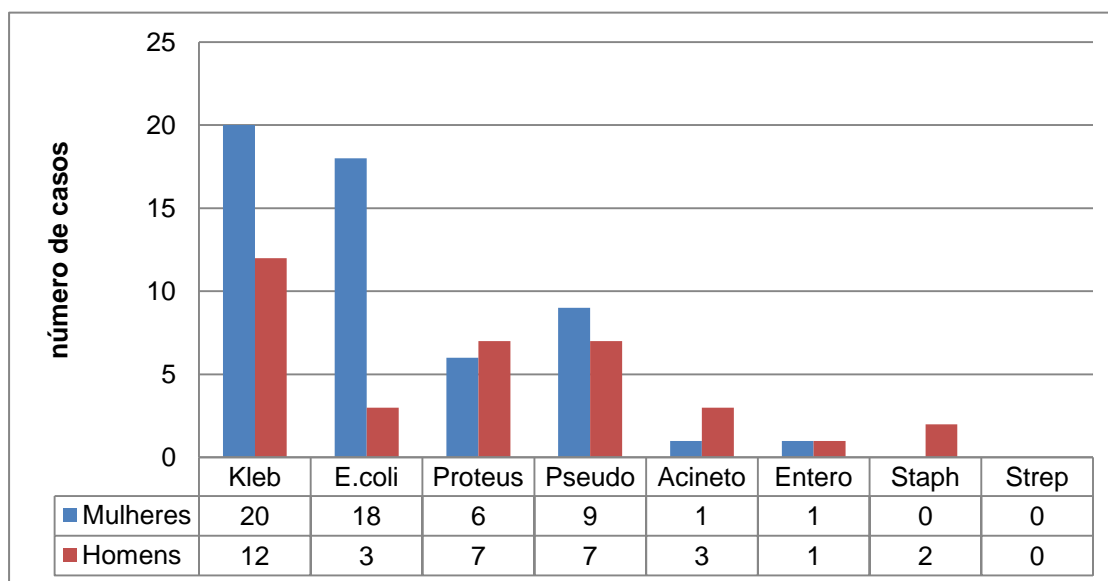
Tendo em conta a grande resistência destas bactérias aos antibióticos, é muito vantajoso recorrer a equipamentos automáticos que auxiliam tanto na identificação do microrganismo como na diversidade de antibióticos a usar.

O aparelho automático Vitek 2 Compact, em 2011, só se encontra disponível no laboratório A e só se utilizava quando o teste de sensibilidade aos antibióticos apresentava inúmeras resistências (resistência a antibióticos de várias classes: derivados das Penicilinas e Cefalosporinas ou Quinolonas e Cefalosporinas) ou quando a identificação de um organismo era dúbia e de difícil interpretação.

No laboratório B, este estudo não foi realizado. Na análise de bactérias multirresistentes, utilizava-se o ATB Pse que facultava uma maior diversidade de antibióticos. No *software* do programa utilizado não foi possível verificar a presença de bactérias multirresistentes.

Neste capítulo, irá ser abordada a presença e resistência de bactérias multirresistentes na zona de estudo a partir dos dados recolhidos do aparelho automático Vitek 2 Compact. Todas as bactérias estudadas neste capítulo foram selecionadas pelos especialistas em análises clínicas do laboratório A como multirresistentes pelo método do TSA manual e, conseqüentemente, analisadas pelo aparelho automático.

Numa primeira abordagem, estabeleceu-se a prevalência de bactérias multirresistentes na comunidade/população em estudo. Esta prevalência, evidenciada no gráfico 10, sugere que a principal bactéria multirresistente isolada na zona em estudo é do género *Klebsiella spp.*



**Gráfico 10 - Prevalência de bactérias multirresistentes**

**Legenda:** Kleb – *Klebsiella spp*, E.coli – *Escherichia coli*, Proteus – *Proteus spp*, Pseudo – *Pseudomonas spp*, Acineto – *Acinetobacter spp*, Entero – *Enterococcus spp*, Staph – *Staphylococcus spp*, Strep – *Streptococcus spp*.

Embora *E.coli* seja a bactéria mais frequentemente isolada de amostras de urina colhida aseticamente para estudos bacteriológicos, não é a que origina mais resistências aos antibióticos. A *Klebsiella spp* é, segundo este estudo, a prevalente entre as bactérias multirresistentes.

*Pseudomonas spp* surge em terceiro lugar como prevalente entre as multirresistentes e afetando com maior predominância as mulheres.

*Proteus spp* e *Enterococcus spp* afetam de modo semelhante homens e mulheres, sendo a primeira prevalente em relação à outra.

*Acinetobacter baumannii* é, segundo o estudo, uma bactéria que tem uma maior incidência nos homens e a quinta mais prevalente como causa de infecção do trato urinário por bactérias multirresistentes.

O *Staphylococcus spp* é a única bactéria multirresistente identificada que não afeta indivíduos do gênero feminino, estando descritos apenas 2 casos de infecção em indivíduos masculinos.

De notar que não houve uma única multirresistência do gênero *Streptococcus spp*, em uroculturas, o que pressupõe que esta bactéria não adquire resistências tão facilmente como as restantes, sendo de fácil tratamento e bom prognóstico quando encontrada na urina. As percentagens de resistência destas bactérias também foram identificadas.

Sabendo previamente que se tratava de bactérias multirresistentes, alargou-se a família/classe de antibióticos a ser analisados. Os antibióticos analisados foram os  $\beta$ -lactâmicos (Amoxicilina, Amoxicilina com Ácido Clavulânico, Cefotaxima, Ceftazidima, Imipenem e Meropenem), Quinolonas (Norfloxacin e Ciprofloxacin), Aminoglicosídeos (Gentamicina), associação do Trimetoprim/Sulfametoxazol e Nitrofuranos (Nitrofurantoína).

**Tabela 5 – Percentagens de resistência de bactérias Gram negativas multirresistentes isoladas em mulheres**

<b>Antibiótico</b>	<b>Kleb</b>	<b>E.coli</b>	<b>Proteus</b>	<b>Pseudo</b>
	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>
Amoxicilina	100%	94%	100%	90%
Amox+Ac.Cla	20%	28%	83%	90%
Cefotaxima	65%	72%	17%	50%
Ceftazidima	50%	44%	16%	20%
Imipenem	0%	0%	17%	30%
Meropenem	0%	0%	0%	30%
Norfloxacin	90%	94%	83%	70%
Ciprofloxacin	95%	94%	67%	80%
Gentamicina	55%	61%	0%	40%
Trim/Sul	95%	72%	67%	90%
Nitrofurantoína	65%	0%	100%	90%

**Legenda:** Kleb – *Klebsiella spp*, E.coli – *Escherichia coli*, Proteus – *Proteus spp*, Pseudo – *Pseudomonas spp*, Res – Resistência, Amox+Ac.Clav – Amoxicilina mais Ácido Clavulânico, Trim/Sul – Trimetoprim/Sulfametoxazol

A tabela 5 demonstra que, na área de estudo, a bactéria do género *Pseudomonas spp*, embora sendo a terceira prevalente, é a principal responsável pela grande quantidade de resistência aos antibióticos, pois, de um modo geral, é a que apresenta maiores percentagens de resistência, principalmente aos Carbapenemos. O género *Proteus spp* encontrado não apresentou resistência à Gentamicina e *E.coli* à Nitrofurantoína. As bactérias do género *Klebsiella spp* apresentam pouca resistência à associação Amoxicilina com Ácido Clavulânico e nenhuma resistência aos Carbapenemos.

**Tabela 6 – Percentagens de resistência de bactérias Gram negativas multirresistentes isoladas em homens**

<b>Antibiótico</b>	<b>Kleb</b>	<b>E.coli</b>	<b>Proteus</b>	<b>Pseudo</b>
	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>
Amoxicilina	100%	100%	100%	100%
Amox+Ac.Cla	50%	33%	100%	100%
Cefotaxima	67%	100%	57%	71%
Ceftazidima	59%	67%	0%	29%
Imipenem	0%	0%	14%	14%
Meropenem	9%	0%	14%	14%
Norfloxacina	75%	100%	86%	71%
Ciprofloxacina	83%	100%	72%	72%
Gentamicina	25%	67%	43%	71%
Trim/Sul	83%	100%	71%	86%
Nitrofurantoina	75%	33%	86%	86%

**Legenda:** Kleb – *Klebsiella spp*, E.coli – *Escherichia coli*, Proteus – *Proteus spp*, Pseudo – *Pseudomonas spp*, Res – Resistência, Amox+Ac.Clav – Amoxicilina mais Ácido Clavulânico, Trim/Sul – Trimetoprim/Sulfametoxazol

Nos homens, o perfil de resistências destas bactérias é diferente. *E.coli* aparece com total resistência a grande parte dos antibióticos. O gênero *Pseudomonas spp* não possui grandes percentagens de resistência mas, mesmo assim, é preocupante, visto apresentar resistência a todos os antibióticos usados (tabela 6).

**Tabela 7 – Percentagens de resistência de bactérias Gram positivas multirresistentes isoladas em homens**

<b>Antibiótico</b>	<b>Entero</b>	<b>Staph</b>	<b>Strep</b>
	<b>Res</b>	<b>Res</b>	<b>Res</b>
Amoxicilina	100%)	100%	0%
Amox+Ac.Cla	100%	100%	0%
Cefotaxima	100%	50%	0%
Ceftazidima	100%	50%	0%
Imipenem	0%	0%	0%
Meropenem	0%	0%	0%
Norfloxacina	100%	50%	0%
Ciprofloxacina	100%	50%	0%
Gentamicina	0%	50%	0%
Trim/Sul	100%	50%	0%
Nitrofurantoína	0%	50%	0%

**Legenda:** Entero – *Enterococcus spp*, Staph – *Staphylococcus spp*, Strep – *Streptococcus spp*, Res – Resistência, Amox+Ac.Clav – Amoxicilina mais Ácido Clavulânico, Trim/Sul – Trimetoprim/Sulfametoxazol

*Enterococcus spp* não apresenta resistência à Nitrofurantoína, Gentamicina e Carbapenemos, enquanto que o *Staphylococcus spp* é somente aos Carbapenemos.

Map of the Municipality of Castelo Branco showing the distribution of health centers by parish. The map is color-coded by region: green for the north, yellow for the center, and orange for the south. Each parish is labeled with its name, the number of health centers, and icons representing different types of centers (house, people, wheelchair, and a blue 'H' for Hospital). A red box highlights the 'Sardoal' parish.

Parish	Health Centers	Icons
Penamacor	1	People
Idanha-a-Nova	3	People, Wheelchair
Castelo Branco	26	People, Hospital (H)
Vila Velha de Ródão	2	People
Proença-a-Nova	1	People
Oleiros	1	People, Wheelchair
Serã	13	House, People, Wheelchair
Vila de Rei	14	House, People, Wheelchair
Mação	1	People, Wheelchair
Sardoal	1	People, Wheelchair
Abrantes	3	People

**Figura 2 - Área afetada por bactérias multirresistentes**

**Legenda:** 👤 - Comunidade, 🏠 - Lares de idosos e 🏡 - Unidade de Cuidados Continuados. 🏥 - Hospital público. Número de casos consoante tipologia, ex: 1 👤 - indica um caso de uma bactéria multirresistente na comunidade.

A figura 2 apresenta todos os casos de bactérias multirresistentes encontrados pelo laboratório A durante o ano de 2011. Nela estão evidenciados os casos consoante o local (comunidade, lares de idosos ou UCC) onde o paciente efetuou a análise bacteriológica de urina.

Os concelhos de Pampilhosa da Serra e Fundão, que pertencem à zona de estudo, não apresentaram qualquer referência a estes casos. Isto deve-se sobretudo a que estes concelhos estejam sob uma maior influência do laboratório B, cujos dados não entraram neste capítulo.

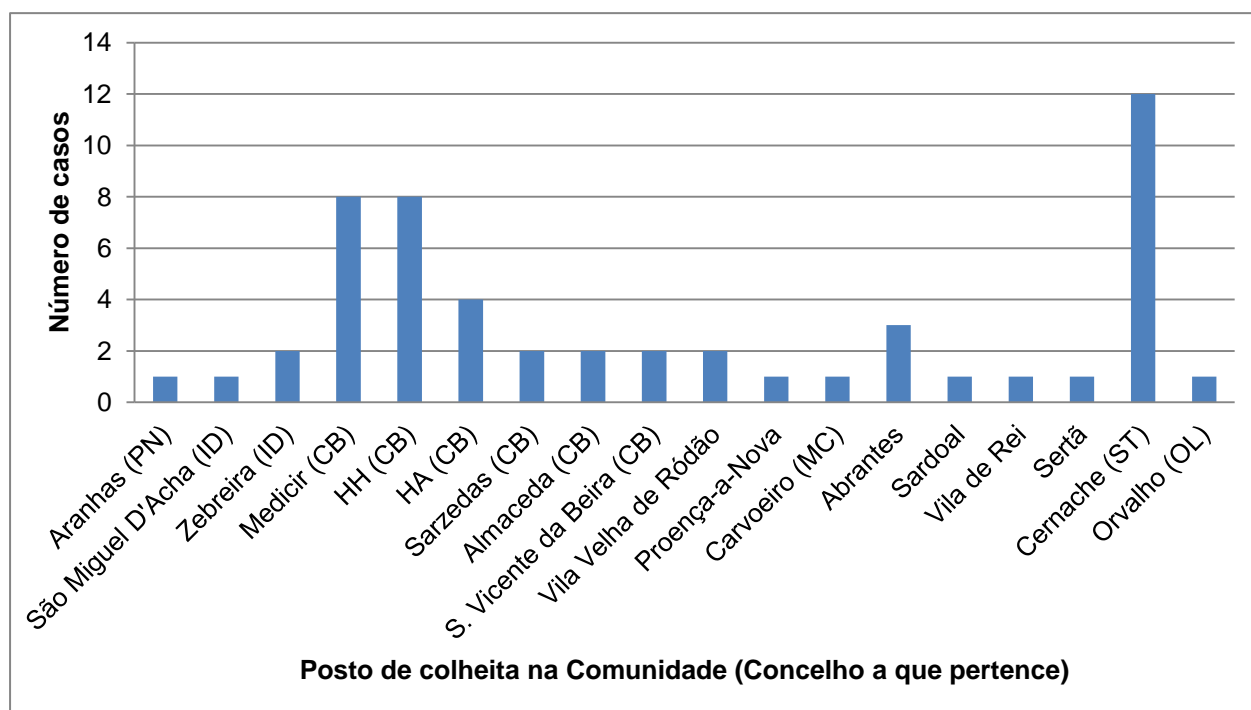
Castelo Branco é o concelho que apresenta a maior quantidade de casos de bactérias multirresistentes. Isto pode dever-se sobretudo a ser a cidade capital de distrito e estar sob a influência de apenas dois laboratórios de análises clínicas, ao contrário da cidade de Abrantes que apresenta mais laboratórios e por isso só foram detetados apenas 3 casos.

Às UCC situadas na zona de estudo também apresentam um elevado número de casos. Em Vila de Rei, concelho onde se encontra uma UCC, apresenta 14 casos, no entanto, na comunidade existe apenas 1 e em lares de idosos 2.

A outra UCC presente no estudo situa-se numa freguesia do concelho de Sertão, Cernache. Este concelho, embora com muito menos população que o concelho de Castelo Branco (15880 contra 56109), apresenta mais casos de bactérias multirresistentes, sendo o concelho mais afetado por esta problemática. Os lares de idosos apresentam 10 casos na zona de estudo, sendo o concelho de Idanha-a-Nova o mais afetado com 3.

Sabendo que a comunidade é a mais afetada por esta problemática, o gráfico 11 apresenta uma visão mais pormenorizada do estudo e sugere que o posto de colheitas Medicir e HH (Castelo Branco) e Cernache (Sertão) são os que mais apresentam origem de bactérias multirresistentes. No entanto, estes resultados podem ser falaciosos e serão analisados minuciosamente.

Neste gráfico está evidenciado o posto de colheita na comunidade e o concelho ao qual pertencem. São 53 casos distribuídos pela zona de estudo.



**Gráfico 11 - Prevalência de bactérias multirresistentes consoante o posto de colheita**

**Legenda:** PN – Penamacor, ID – Idanha-a-Nova, CB – Castelo Branco, MC – Mação, ST – Sertã, OL – Oleiros.

No decorrer desta análise, surge um fator que pode ser responsável pelo inviesamento dos dados, no entanto pode não ser o único. Um deles é a **não identificação** do local onde se recolheu a amostra na ficha do paciente por parte dos técnicos responsáveis pela abertura dos processos. Assim, um paciente de um lar de idosos ou de UCC se não for identificado como pertencendo a um lar/UCC irá ser contado como um paciente que se dirigiu ao posto de colheitas (comunidade). Todos os dados dos pacientes foram retirados do programa informático e-deia e por isso o tratamento de resultados está sujeito à informação disponível e apresentada pelo programa.

Dos locais/postos de colheita acima referidos, todos eles possuem pelo menos um lar para idosos na área, por isso, se o técnico de análises clínicas não identificou o paciente como pertencendo a um lar, este irá ser contado como pertencendo à comunidade.

Os postos de colheitas HH, HA e Medicir situam-se na cidade de Castelo Branco e são designados de verdadeira comunidade, uma vez que os pacientes se dirigem a estes locais para fazer análises, evidenciando que não apresentam qualquer problema de

locomoção, ao contrário dos pacientes que se encontram internados em lares ou UCC's.

Em Abrantes, Cernache do Bonjardim, Sarzedas, Carvoeiro e Sardoal existe um único equipamento social (lar de idosos) que pertence a uma única instituição (ex: Santa Casa da Misericórdia). A freguesia de Sertã tem 2 equipamentos pertencendo à mesma instituição, Vila Velha de Ródão possui 4 equipamentos correspondentes a 2 instituições. Em Orvalho, existem 2 equipamentos de ação social pertencendo à mesma instituição, Vila de Rei e Proença-a-Nova possuem 2 instituições com 3 equipamentos à população adulta cada.

São Miguel D'Acha e Aranhas são postos de colheita que não apresentam qualquer equipamento de ação social à população adulta (12), por isso estes casos se tratam como pertencendo à verdadeira comunidade.

O posto HH, HA e Medicir situam-se na cidade de Castelo Branco. Os dois primeiros são postos pertencendo ao laboratório A, o posto Medicir pertence a outro laboratório (não-A, não-B) mas pertence ao mesmo grupo que o laboratório A, por isso as suas análises são encaminhadas diretamente para o laboratório A.

Um fator que explica a grande prevalência de bactérias com multirresistência no posto Medicir poderá ter a ver com a deslocação anual para efetuar colheitas em lares de idosos no concelho de Vila Velha de Ródão. Estes possuem um contrato somente com este posto e, no sistema informático, não aparece qualquer referência ao local onde foi realizada a colheita.

O posto de Cernache também apresenta uma grande incidência de bactérias multirresistentes, 12 no posto de colheita da comunidade e 13 na UCC. O número de casos na UCC pode ainda ser mais elevado, uma vez que, por vezes, não se identifica o paciente no local onde se efetuou a colheita como pertencendo à UCC, ou seja, esse paciente irá ser contado como pertencendo à comunidade. Outra desvantagem deste posto é que a UCC presente nesta freguesia não tem um código específico dado pelo laboratório, ao contrário da UCC de Vila de Rei. Assim, é mais difícil ter uma boa exatidão e precisão.

Embora muitos casos de bactérias multirresistentes sejam erradamente contados como pertencentes à comunidade, posto Medicir e Cernache, pode ainda haver outro fator que pode explicar estes casos: a transmissão de bactérias multirresistentes da UCC ou lares de idosos para a comunidade. Este problema é estudado e existem



evidências científicas da transferência de bactérias multirresistentes entre pacientes destas unidades através da contaminação das mãos dos profissionais de saúde e através do contato com o paciente para o ambiente envolvente (31). Além disso, estas unidades de apoio à população servem como pontos de visita de vários familiares e amigos aos pacientes. De fato, se não forem tomadas medidas preventivas, podem ocorrer pequenos surtos, quer na comunidade, quer no meio envolvente.

Raramente, as ITU são responsáveis pelo internamento em UCC, no entanto, o internamento nestes centros pode dever-se a uma grande variedade de circunstâncias: redução dos custos hospitalares, infeções transmitidas no hospital entre outros (32). Estes centros têm pacientes com uma grande probabilidade para ocorrer ITU uma vez que se encontram em condições imunitárias muito débeis, o que favorece o aparecimento de flora saprófita na urina. Muitos são idosos e encontram-se algaliados, acamados e com terapêutica muito agressiva (radioterapia, quimioterapia).

#### **Análise do fenótipo de resistência de isolados apresentando multirresistência seleccionados no estudo**

De um ponto de vista mais detalhado, e tendo em conta a presença de bactérias multirresistentes na zona do estudo, foi evidenciado o perfil de resistência de cada isolado bacteriano, bem como a idade do paciente, o seu género, a origem e o TSA, que inclui os vários antibióticos utilizados. Toda esta informação encontra-se disponível nas próximas tabelas.

**Tabela 8 – Perfil de resistência de bactérias multirresistentes pertencentes ao género *Klebsiella* spp na zona de estudo**

Id	G	P	Iso	Tip	A	ACI	Cfr	Cft	Cfz	Cfx	I	M	P/T	Ofi	Nor	Cip	Gen	Ami	Net	Tet	T/S	Nit
84	M	CB	Klb	Com	R	I		R	I	S	S	S		R	R	R	R		I		R	R
61	M	ABR	Klb	Com	R	R		R	S		S	S		R	R	R	R				R	R
60	H	CB	Klb	Com	R	R		R	I		S	S		R	R	R	S		S		S	R
82	H	VR	Klb	Lar	R	S		R	R		S	S	S		R	R					R	R
82	M	ST	Klb	UCC	R	I		R			S	S		R	R		R	S			R	R
73	M	ST	Klb	Com	R	I		R	R		S	S		R	R	R	R				R	S
57	M	VV	Klb	Com	R	I	R		R		S	S			R	R	R				R	S
76	H	VR	Klb	UCC	R	I		R	I		S	S			R	R				S	R	R
62	M	VR	Klb	UCC	R	I		S	R		S	S			R	R		S			R	
84	M	VR	Klb	Lar	R	R		I	I		S	S			R	R	S				R	S
71	M	ST	Klb	Com	R	R			R	R	S	S			R	R	R	S			R	I
66	M	MC	Klb	Com	R				I		S	S				R	R	I			R	
62	H	VR	Klb	UCC	R	R		R	R		S	S			R	R	R				R	S
89	M	ST	Klb	Com	R	I		R	I	S	S	S		R		R	S				R	R
87	M	OL	Klb	Com	R	I		I	R		S	S			R	R	S	S			R	R
91	M	CB	Klb	Com	R	I	R	R	I	S	S	S			R	R	R		R	S	R	R
56	M	ABR	Klb	Com	R	I	R	R	I	S	S	S		R	R	R			R		R	R
94	M	CB	Klb	Com	R	I		I	I	S	S	S		R	R	R	R		I	S		R
94	M	ST	Klb	Com	R	I		R	R		S	S		R	R	R	R	S	I		R	R
56	M	ABR	Klb	Com	R	I		R	R		S	S		R	R	R					R	R
40	M	VR	Klb	UCC	R	I		R	R		S	S	I		R	R					R	S
94	M	ST	Klb	Lar	R	I		R	R		S	S			R	R	R				R	R
40	M	VR	Klb	UCC	R	I	R	R			S	S			R	R	S				R	R
89	H	ID	Klb	Lar	R	R		S	R		S	S			R	R	S				R	R
33	H	ST	Klb	UCC	R				R		I	R				R	S				R	
71	M	ST	Klb	UCC	R	R		R	R		S	S			R	R	S				R	R
34	H	ST	Klb	UCC	R	R		R		S	S				R	R	S				R	R
58	H	CB	Klb	Com	R	R			S		S	S				S	S				S	
34	H	ST	Klb	UCC	R	R			R	S	S	S			R	R	R				R	R
90	H	ID	Klb	Lar	R	I		R	R	S	S	S					S				R	R
34	H	ST	Klb	UCC	R	I		R	R		S	S			R	R	S				R	R
58	H	CB	Klb	Com	R	I		R	I		S	S			R	R	R	S			R	R

**Legenda:** id-Idade, G-Género, P-Posto de colheita, Iso – Isolado bacteriano, Tip - Tipologia, **Antibióticos β-lactâmicos, Quinolonas, Aminoglicosídeos, Tetraciclínas, Sulfonamidas e suas associações, Nitrofuranos**, A - Amoxicilina, ACI - Amoxicilina com Ácido Clavulânico, Cfr – Cefuroxima, Cft – Cefotaxima, Cfz – Ceftazidima, Cfx – Cefoxitina, I – Imipenem, M – Meropenem, P/T – Piperacilina/Tazobactam, Ofi – Ofloxacina, Nor – Norfloxacin, Cip – Ciprofloxacina, Gen – Gentamicina, Ami – Amicacina, Net – Netilmicina, Tet – Tetraciclina, T/S – Trimetoprim/Sulfametoxazol, Nit – Nitrofurantóina, H – Homem, M – Mulher, CB – Castelo Branco, ABR – Abrantes, VR – Vila de Rei, ST – Sertão, VV – Vila Velha de Ródão, MC – Mação, OL – Oleiros, ID – Idanha-a-Nova, SAR – Sardoal, PR – Proença-a-Nova, Klb – *Klebsiella* spp, Com – Comunidade, Lar – Lar de idosos, UCC - Unidade de Cuidados Continuados, R – Resistente, S – Suscetível ou Sensível, I - Intermédio

Na tabela 8 estão documentados todos os casos encontrados de ITU causadas por *Klebsiella spp* multirresistentes, estas foram encontradas em todas os locais/tipologias: comunidade, lares de idosos e UCC's. Embora sejam consideradas multirresistentes, muitas apresentam uma sensibilidade intermédia para a associação Amoxicilina com Ácido Clavulânico e praticamente todas são sensíveis aos carbapenemos (Imipenem e Meropenem) . O caso mais problemático causado por esta bactéria vem de uma UCC, é resistente ao Meropenem e apresenta sensibilidade intermédia ao Imipenem.

**Tabela 9 - Perfil de resistência de bactérias *Escherichia coli* multirresistentes na zona de estudo**

Id	G	P	Iso	Tip	A	ACI	Cfr	Cft	Cfz	Cfx	I	M	Ofi	Nor	Cip	Gen	Net	Tet	T/S	Nit
71	M	SAR	Eco	Lar	R	I		R	I		S	S	R	R	R	S	S		S	S
86	M	VV	Eco	Com	R	I	R	R	I		S	S	R	R	R	R			R	S
80	M	CB	Eco	Com	R	R		I	R		S	S	R	R	R	R	I		R	S
84	M	VR	Eco	UCC	R	R		R	R		S	S	R	R		R	R		R	S
86	M	PR	Eco	Com	R	R		S	R		S	S	R	R	R	R	I		S	S
80	M	ST	Eco	UCC	R	I		R	R		S	S	R	R	R	R			R	S
83	M	ST	Eco	Com	R	R		S	R		S	S	R	R	R	R	R		S	S
89	H	ID	Eco	Lar	R	I		R	I		S	S		R	R	R			R	S
82	M	MC	Eco	Lar	R	I		R	I	S	S	S		R	R	R			S	S
74	M	CB	Eco	Com	R	I		R	I		S	S		R	R	R			R	S
70	M	ID	Eco	Com	R	I		R	I		S	S		R	R					I
84	M	CB	Eco	Com	R	R		R	R		S	S		R	R	R			R	S
41	M	VR	Eco	UCC	R	I		R	I		S	S		R	R	R			R	S
92	M	VR	Eco	UCC	R	I		R		S	S			R	R				R	I
74	H	ST	Eco	Com	R	I		R	R		S	S		R	R	R			R	S
84	M	CB	Eco	Com	R			R	I		S	S		R	R			R	R	S
81	M	CB	Eco	Com		I			I		S	S			R	S			R	S
94	M	ST	Eco	Com	R	I		R	I		S	S		R	R				R	S
94	M	ST	Eco	Com	R	I			R		S	S		R	R				R	S
57	H	CB	Eco	Com	R	R		R	R	S	S	S		R	R	S			R	R
94	M	ST	Eco	Lar	R	I		R	R		S	S		R	R	R			R	S

**Legenda:** id-Idade, G-Género, P-Posto de colheita, Iso – Isolados bacterianos, Tip - Tipologia, **Antibióticos β-lactâmicos, Quinolonas, Aminoglicosídeos, Tetraciclínas, Sulfonamidas e suas associações, Nitrofuranos**, A - Amoxicilina, ACI - Amoxicilina com Ácido Clavulânico, Cfr – Cefuroxima, Cft – Cefotaxima, Cfz – Ceftazidima, Cfx – Cefoxitina, I – Imipenem, M – Meropenem, Ofi – Ofloxacina, Nor – Norfloxacin, Cip – Ciprofloxacina, Gen – Gentamicina, Net – Netilmicina, Tet – Tetraciclina, T/S – Trimetoprim/Sulfametoxazol, Nit – Nitrofurantoína, H – Homem, M – Mulher, CB – Castelo Branco, VR – Vila de Rei, ST – Sertão, VV – Vila Velha de Ródão, MC – Mação, ID – Idanha-a-Nova, SAR – Sardoal, PR – Proença-a-Nova, Eco – *Escherichia coli*, Com – Comunidade, Lar – Lar de idosos, UCC - Unidade de Cuidados Continuados, R – Resistente, S – Suscetível ou Sensível, I - Intermédio

Na tabela 9, *Escherichia coli* possui um perfil de resistências em que se nota sensibilidade destas bactérias multirresistentes à Nitrofurantoína (exceto um caso) e aos Carbapenemos. Todas as bactérias isoladas são resistentes às Quinolonas. Embora sejam bactérias multirresistentes todos os isolados são sensíveis aos carbapenemos.

**Tabela 10 - Perfil de resistência de bactérias multirresistentes pertencentes ao gênero *Proteus spp* na zona de estudo**

Id	G	P	Iso	Tip	A	ACI	Cfr	Cft	Cfz	I	M	Ofi	Nor	Cip	Gen	Ami	Net	T/S	Nit
44	H	SAR	Pro	Com	R	R		S	S	S	S	R	I	R	R		I	R	R
82	M	CB	Pro	Com	R	S			S	R	S	R	R	R	S			S	R
82	M	ST	Pro	Com	R	R		R	R	S	S	R	R		S		S	R	R
88	H	OL	Pro	Lar	R	R		R	S	S	S	R	R	S	S		I	R	R
89	M	ST	Pro	Com	R	R			S	S	S	R	R	R	S				R
85	H	CB	Pro	Com	R	R		R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R
92	H	VR	Pro	UCC	R	R		S	S	S		R	R				R	R	I
83	H	ST	Pro	UCC	R	R	R	R	I	S	S	R	R	R	R			R	R
81	M	VR	Pro	Com	R	R		I		S	S		S	S	S			R	R
87	H	CB	Pro	Com	R	R		R	I	R	R	R	R	R	S			S	R
83	H	CB	Pro	Com	R	R	S	S	S	S			R	R	R			S	R
71	M	ST	Pro	UCC	R	R		I	I	S	S		R	R				R	R
94	M	ST	Pro	Com	R	R	S	S	S	S	S		R	R		S		R	R

**Legenda:** id-Idade, G-Gênero, P-Posto de colheita, Iso – Isolado bacteriano, Tip - Tipologia, **Antibióticos β-lactâmicos, Quinolonas, Aminoglicosídeos, Sulfonamidas e suas associações, Nitrofuranos**, A - Amoxicilina, ACI - Amoxicilina com Ácido Clavulânico, Cfr – Cefuroxima, Cft – Cefotaxima, Cfz – Ceftazidima, I – Imipenem, M – Meropenem, Ofi – Ofloxacina, Nor – Norfloxacin, Cip – Ciprofloxacina, Gen – Gentamicina, Ami – Amicacina, Net – Netilmicina, T/S – Trimetoprim/Sulfametoxazol, Nit – Nitrofurantoína, H – Homem, M – Mulher, CB – Castelo Branco, VR – Vila de Rei, ST – Sertão, OL – Oleiros, SAR – Sardoal, Pro – *Proteus spp*, Com – Comunidade, Lar – Lar de idosos, UCC - Unidade de Cuidados Continuados, R – Resistente, S – Suscetível ou Sensível, I – Intermédio.

*Proteus spp* apresenta resistência à Amoxicilina, Amoxicilina com Ácido Clavulânico, Quinolonas, Trimetoprim/Sulfametoxazol e Nitrofurantoína que é detetada em praticamente todos os casos, no entanto, a sensibilidade à Ceftazidima e em alguns casos à Gentamicina parece ser comum a grande parte destas bactérias. Alguns destes isolados patogénicos são sensíveis aos Carbapenemos, exceto dois. Esses casos são detetados na comunidade (Castelo Branco) em pacientes com uma idade superior a 80 anos (tabela 10).

**Tabela 11 - Perfil de resistência de bactérias multirresistentes pertencentes ao gênero *Pseudomonas spp* na zona de estudo**

Id	G	P	Iso	Tip	A	ACI	Cfr	Cft	Cfz	Cfx	I	M	P/T	Ofi	Nor	Cip	Gen	Ami	Net	T/S	Nit
85	M	VR	Pse	UCC	R	R			I	R	S	S		R	S	S	S		I	R	R
54	M	CB	Pse	Com	R	R			R	R	I	S		R	R	R	R			R	R
87	H	VR	Pse	UCC	R	R			S	R	S	S			R	R	R			R	R
77	M	ST	Pse	Com	R	R			S	R	S				R	R				R	R
88	M	CB	Pse	Com	R	R			R		R	R			R	R	I	S		R	R
74	M	VR	Pse	UCC	R	R			S	I	R	R			R	R	R	R		R	R
31	H	CB	Pse	Com	R	R				R	S	S			R	R	R	R		R	R
45	M	ID	Pse	Com	R	R		R	S		S	S	S	R	R	R	R	S	I	R	R
33	H	ST	Pse	UCC	R	R		R	R		S	S		R	R	R	R		R	R	R
87	H	CB	Pse	Com	R	R		R	I		S					S	S		R	R	R
33	H	ST	Pse	UCC	R	R			S		S	S		R	R	R	R			R	R
83	H	CB	Pse	Com	R	R			S		S		S			R	R			R	
33	H	ST	Pse	UCC	R	R	R	R	R		R	R			R		R	S	R	R	R
94	M	ST	Pse	Com	R	R		R	I		R	R			R	R	R			R	R
71	M	ST	Pse	UCC	R	R			S		S	S				R	I	S		R	R
45	M	ID	Pse	Com	R	R		I	S		S	S			R	R		S		R	R

**Legenda:** id-Idade, G-Gênero, P-Posto de colheita, Iso – Isolado bacteriano, Tip - Tipologia, **Antibióticos β-lactâmicos, Quinolonas, Aminoglicosídeos, Sulfonamidas e suas associações, Nitrofuranos**, A - Amoxicilina, ACI - Amoxicilina com Ácido Clavulânico, Cfr – Cefuroxima, Cft – Cefotaxima, Cfz – Ceftazidima, Cfx – Cefoxitina, I – Imipenem, M – Meropenem, P/T – Piperacilina/Tazobactam, Ofi – Ofloxacina, Nor – Norfloxacina, Cip – Ciprofloxacina, Gen – Gentamicina, Ami – Amicacina, Net – Netilmicina, T/S – Trimetoprim/Sulfametoxazol, Nit – Nitrofurantoína, H – Homem, M – Mulher, CB – Castelo Branco, VR – Vila de Rei, ST – Sertão, ID – Idanha-a-Nova, Pse – *Pseudomonas spp*, Com – Comunidade, UCC - Unidade de Cuidados Continuados, R – Resistente, S – Suscetível ou Sensível, I - Intermédio

Na tabela 11 está descrito o comportamento face aos antibióticos de isolados pertencentes a *Pseudomonas spp*. Dos 16 casos existentes, foram documentados 9 casos na comunidade e 7 casos em UCC's. Os casos mais problemáticos vêm essencialmente das UCC's, note-se o caso severo de um homem de 33 anos da UCC situada em Cernache, concelho de Sertão. Estes 2 casos são na verdade um único, isto porque o paciente realizou várias colheitas ao longo do ano de 2011, em duas delas foi isolado o agente patogénico – *Pseudomonas spp*. Pode-se constatar que numa primeira fase (seta azul claro) a bactéria apresentava um quadro de multirresistência sendo unicamente sensível aos Carbapenemos, após esta análise o paciente realizou novamente uma análise bacteriológica de urina tendo sido isolada novamente *Pseudomonas spp*, no entanto, apresentando resistência aos carbapenemos (seta azul escuro).

**Tabela 12 - Perfil de resistência de bactérias *Acinetobacter baumannii* multirresistentes na zona de estudo**

Id	G	P	Iso	Tip	A	ACI	Cft	Cfz	I	M	Nor	Cip	Gen	Ami	Net	T/S	Nit
60	H	CB	Ac	Com	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S		R	R
52	H	VR	Ac	UCC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
81	H	CB	Ac	Com	R	R		S	R		R	R	S			S	R
32	M	CB	Ac	Com	R	R		S			S	S				R	R

**Legenda:** id-Idade, G-Gênero, P-Posto de colheita, Iso - Isolado bacteriano, Tip - Tipologia, **Antibióticos β-lactâmicos, Quinolonas, Aminoglicosídeos, Sulfonamidas e suas associações, Nitrofuranos**, A - Amoxicilina, ACI - Amoxicilina com Ácido Clavulânico, Cft – Cefotaxima, Cfz – Ceftazidima, I – Imipenem, M – Meropenem, Nor – Norfloxacin, Cip – Ciprofloxacina, Gen – Gentamicina, Ami – Amicacina, Net – Netilmicina, T/S – Trimetoprim/Sulfametoxazol, Nit – Nitrofurantoína, H – Homem, M – Mulher, CB – Castelo Branco, VR – Vila de Rei, Ac – *Acinetobacter baumannii*, Com – Comunidade, UCC - Unidade de Cuidados Continuados, R – Resistente, S – Suscetível ou Sensível, I - Intermédio

Os casos de infeções por *Acinetobacter baumannii* são particularmente graves, isto porque é uma bactéria que não é normalmente encontrada na comunidade estando mais associada a ambiente hospitalar e a pacientes idosos. Foram descritos 3 casos na comunidade mas é o caso encontrado na UCC que mais resistências apresenta e mais problemas poderá causar. A disseminação de bactérias multirresistentes nestes ambientes em que há a prestação de cuidados de saúde é conhecida e está bem documentada (31), portanto é necessário ter em conta medidas preventivas que dificultem a colonização dos pacientes por estes agentes. Foi talvez isso que não aconteceu e que levou a uma ITU numa mulher de 32 anos que circula na comunidade. Estes casos que foram documentados na comunidade são de Castelo Branco, cidade capital de distrito onde se encontra um hospital, talvez este local fosse o local de colonização destes 3 pacientes que agora apresentem ITU (tabela 12).

As ITU causadas por bactérias multirresistentes *Proteus spp*, *Pseudomonas spp* e *Acinetobacter baumannii* podem ser particularmente difíceis no tratamento por antibióticos, visto apresentarem, de um modo geral, resistência a um conjunto alargado de diferentes famílias de antibióticos. *Klebsiella spp* é também preocupante não só pelo elevado número de infeções que causa mas também pela grande capacidade de resistência que possui a várias famílias de antibióticos. *Escherichia coli* parece ser a bactéria multirresistente que é de melhor prognóstico, sensível na maioria dos casos à Nitrofurantoína.

Embora entre as bactérias multirresistentes predominem as de Gram negativo, foram obtidos isolados de bactérias de Gram positivo apresentando multirresistência. A informação detalhada está descrita na tabela 13.

**Tabela 13 - Perfil de resistência de bactérias Gram positivas multirresistentes na zona de estudo**

Id	G	P	BAC	Tip	A	ACI	Cft	Cfz	I	Ofl	Nor	Cip	Lev	Eri	Gen	Ise	Tei	Van	Lzd	Tet	Tig	T/S	Nit
71	H	CB	Ent	Com	R	R		R			R	R		R	S		S	S	S			R	I
77	M	CB	Ent	Com	R	R	R	R	R		R			R			S	S	S		S	R	R
86	H	PN	Sta	Com	R	R				R	R		R	R			S	S		R		S	S
56	H	VR	Sta	UCC	R	R	R					R	R	R		S		R		R		R	R

**Legenda:** id-Idade, G-Gênero, P-Posto de colheita, Iso – Isolado bacteriano, Tip - Tipologia, **Antibióticos β-lactâmicos, Quinolonas, Macrólidos, Aminoglicosídeos, Glicopeptídeos, Oxazolidinonas, Tetraciclínas, Gliciliclinas, Sulfonamidas e suas associações, Nitrofuranos**, A - Amoxicilina, ACI - Amoxicilina com Ácido Clavulânico, Cft – Cefotaxima, Cfz – Ceftazidima, I – Imipenem, Ofl – Ofloxacina, Nor – Norfloxacin, Cip – Ciprofloxacina, Lev – Levofloxacina, Eri – Eritromicina, Gen – Gentamicina, Ise – Isepamicina, Tei – Teicoplanina, Van – Vancomicina, Lzd – Linezolid, Tet – Tetraciclina, Tig – Tigeciclina, T/S – Trimetoprim/Sulfametoxazol, Nit – Nitrofurantoína, H – Homem, M – Mulher, CB – Castelo Branco, PN – Penamacor, VR – Vila de Rei, Ent – *Enterococcus spp*, Sta – *Staphylococcus spp*, Com – Comunidade, UCC – Unidade de Cuidados Continuados, R – Resistente, S – Suscetível ou Sensível, I - Intermédio

Este trabalho documenta 4 infeções por este tipo de bactérias. *Enterococcus spp* foi encontrado em dois casos presentes na comunidade (Castelo Branco). ITU causadas por *Staphylococcus spp* multirresistentes foram descritas na comunidade e UCC. No caso encontrado da comunidade, o isolado apresenta apenas sensibilidade à Teicoplanina, Vancomicina, Trimetoprim/Sulfametoxazol e Nitrofurantoína. O segundo caso causado por *Staphylococcus spp* vem de uma UCC num homem de 56 anos. Este caso é particularmente raro, trata-se de VRSA (Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*). O isolado é resistente a todos os antibióticos mas apresenta sensibilidade à Isepamicina. A isepamicina é o aminoglicosídeo mais recentemente introduzido na clínica e deve ser utilizado apenas nas infeções devidas a microrganismos resistentes à amicacina (33). Este caso demonstra a relevância das UCC's como reservatórios de bactérias resistentes aos antibióticos podendo funcionar como ponto de disseminação para a comunidade.

## Conclusão

Este trabalho permitiu concluir que *Escherichia coli* é a bactéria de Gram negativo predominante como agente infeccioso de ITU em homens e mulheres. De entre as de Gram positivo destaca-se *Enterococcus spp* o que está de acordo com a bibliografia internacional.

Do ponto de vista de resistência aos antibióticos, é possível concluir que existe um número considerável de agentes patogénicos multirresistentes (4%) na comunidade notando-se uma relação desta realidade com a presença de UCC em determinadas zonas e do hospital público. Estas instituições de prestação de cuidados de saúde

poderão representar um reservatório de bactérias multirresistentes funcionando como facilitadores na disseminação para a comunidade. A esta realidade não está provavelmente alheia a colonização dos utentes de UCC's aquando de visitas a ambientes hospitalares e o contato direto com os familiares poderá facilitar a sua disseminação para a comunidade saudável.

Esta realidade demonstra relevância na medida em que poderá condicionar a terapêutica empírica e demonstra a necessidade de orientação terapêutica por análises bacteriológicas de urina.

Este estudo retrospectivo permitiu também ter uma noção de epidemiologia de resistência aos antibióticos nesta localização geográfica e numa população particularmente envelhecida. Num país como Portugal, em que o consumo e as resistências aos antibióticos são vistos pelos cientistas europeus e internacionais como um dos mais altos da Europa em várias classes ou famílias de antibióticos, urge medidas preventivas para que isso não aconteça num futuro próximo (10, 17). Esta necessidade é urgente visto os avanços na terapia antimicrobiana não serem significativos o que torna este cada vez mais um sério problema de saúde pública (26). É necessário e essencial uma abordagem multidisciplinar para controlar e limitar a propagação destes organismos (27), adotando uma atitude preventiva com um trabalho conjunto não só entre médicos, microbiologistas e especialistas em doenças infecciosas (8) mas também entre a comunidade científica, hospitais e unidades de prestação de cuidados de saúde.



## Referências Bibliográficas:

- (1) Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med* 2002 Jul; 113 (1A): 5S-13S
- (2) Nicole LE. Epidemiology of urinary tract infections. *Clin Microbiol Newsl* 2002 Sep; 24 (18): 135-40
- (3) Olson RP, Harrell LJ, Kaye KS. Antibiotic resistance in urinary isolates of escherichia coli from college women with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemoter* 2009 Mar; 53 (3): 1285-86
- (4) Zhanel GG, Hisanaga TL, Laing NM, DeCorby MR, Nichol KA, Weshnoweski B et al. Antibiotic resistance in escherichia coli outpatient urinary isolates: final results from the north american urinary tract infection collaborative alliance (NAUTICA). *Int J Antimicrob Ag* 2006 Feb; 27: 468-75
- (5) Matthews SJ, Lancaster JW. Urinary tract infections in the elderly population. *Am J Geriatr Pharmacother* 2011 Oct; 9 (5): 286-309
- (6) Srivastava RN, Vasudev AS. Urinary tract infections - current management. *Apollo Medicine* 2011 Dec; 8 (4): 270-75
- (7) Cuevas O, Cercenado E, Gimeno M, Marín M, Coronel P, Bouza E. Comparative in vitro activity of cefditoren and other antimicrobials against enterobacteriaceae causing community-acquired uncomplicated urinary tract infections in women: a spanish nationwide multicenter study. *Diagn Micr Infec Dis* 2010 Feb; 67: 251-60
- (8) Johansen TE, Naber K, Wagenlehner F, Tenke P. Patient assessment in urinary tract infections: symptoms, risk factors and antibiotic treatment options. *Surgery* 2011 Jun; 29(6): 265-271
- (9) Wariso KT, Siminialayi IM, Odigie JO. Pattern and antibiogram of urinary tract infection at the university of port harcourt teaching hospital. *Asian Pac J Trop Med* 2010 Jan; 66-9
- (10) Kahlmeter G. Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogens in uncomplicated cystitis in europe. The ECO SENS study. *Int J Antimicrob Ag* 2003; 22: S49-S52

- (11) Censos 2011. Disponível em [http://censos.ine.pt/xportal/xmain?xpid=CENSOS&xpgid=censos2011\\_apresentacao](http://censos.ine.pt/xportal/xmain?xpid=CENSOS&xpgid=censos2011_apresentacao) [acedido em 23/05/2012]
- (12) Apoio à população. Disponível em <http://www.cartasocial.pt> [acedido em 24/05/2012]
- (13) Unidades de cuidados continuados. Disponível em <http://www.rncci.min-saude.pt/rncci/onde/paginas/castelobranco.aspx> [acedido em 24/05/2012]
- (14) Serviço Nacional de Saúde. Disponível em <http://www.min-saude.pt> [acedido em 25/05/2012]
- (15) Schito GC, Naber KG, Botto H, Palou J, Mazzei T, Gualco L, Marchese A. The ARES study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Ag* 2009 Apr; 34:407-13
- (16) Hoban DJ, Nicolle LE, Hawser S, Bouchillon S, Badal R. Antimicrobial susceptibility of global inpatient urinary tract isolates of *Escherichia coli*: results from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) program: 2009–2010. *Diagn Micr Infec Dis* 2011 Mar; 70:507-11
- (17) Kahlmeter G, Poulsen HO. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO-SENS study revisited. *Int J Antimicrob Ag* 2012 Sep; 39: 45-51
- (18) Chen CY, Chen YH, Lu PL, Lin WR, Chen TC, Lin CY. *Proteus mirabilis* urinary tract infection and bacteremia: risk factors, clinical presentation, and outcomes. *J Microbiol Immunol Infect* 2012; 45: 228-36
- (19) Herruzo R, de la Cruz J, Fernández-Aceñero MJ, García-Caballero J. Two consecutive outbreaks of *Acinetobacter baumannii* 1-a in a burn Intensive Care Unit for adults. *Burns* 2004 Jan; 30: 419-23
- (20) Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis* 2008 Dec; 8: 751–62
- (21) Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I, Kelesidis T. Community-acquired *Acinetobacter* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007 Aug; 26: 857-68

- (22) Brogden KA, Guthmiller JM, Taylor CE. Human polymicrobial infections. *Lancet* 2005; 365(9455): 253-5
- (23) Griffiths EC , Pedersen AB, Fenton A, Petchey OL. The nature and consequences of coinfection in humans. *J Infection* 2011 Jun; 63: 200-6
- (24) Lemmen SW, Hafner H, Zolldann D, Stanzel S, Luutticken R. Distribution of multi-resistant gram-negative versus gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *J Hosp Infect* 2004; 56: 191-7
- (25) Denton M. Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Ag* 2007; 29 (Suppl 3): S9-S22
- (26) Rice LB. The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol* 2009 Aug; 12:476-81
- (27) El-Herte RI, Kanj SS, Matar GM, Araj GF. The threat of carbapenem-resistant enterobacteriaceae in Lebanon: an update on the regional and local epidemiology. *J Infect Public Health* 2012 Feb; 5: 233-43
- (28) López-Pueyo MJ, Barcenilla-Gaite F, Amaya-Villar R, Garnacho-Montero J. Antibiotic multiresistance in critical care units. *Med Intensiva* 2011 Jul; 35(1):41-53
- (29) Freire-Moran L, Aronsson B, Manz C, Gyssens IC, So AD, Monnet DL, Cars O. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria—time to react is now. *Drug Resist Update* 2011 Feb; 14: 118-24
- (30) Tseng SH, Lee CM , Lin TY, Chang SC, Chang FY. Emergence and spread of multi-drug resistant organisms: think globally and act locally. *J Microbiol Immunol Infect* 2011 Mar; 44: 157-65
- (31) Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *MMWR*. 2002;51(No. RR -16):1-44.
- (32) Ylipalosaari P, Ala-Kokko TI, Laurila J, Ohtonen P, Syrjala H. Community- and hospital-acquired infections necessitating ICU admission: spectrum, co-morbidities and outcome. *J Infection* 2006; 53:85-92
- (33) Prontuário Terapêutico online. Disponível em <http://www.infarmed.pt/prontuario/index.php> [Acedido em 24/09/2012]

## Anexos:

Mapas dos municípios em que o trabalho foi realizado.



Município de Proença-a-Nova



Município de Pampilhosa da Serra



Município de Penamacor



Município de Mação



Município de Sertão



Município de Vila Velha de Ródão



Município de Oleiros



Município de Sardoal



Município de Abrantes



Município de Vila de Rei



Município de Castelo Branco



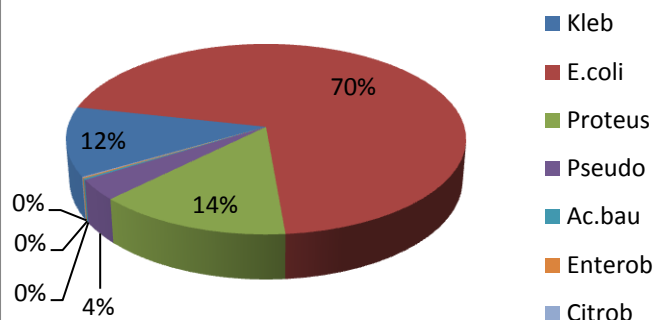
Município de Idanha-a-Nova



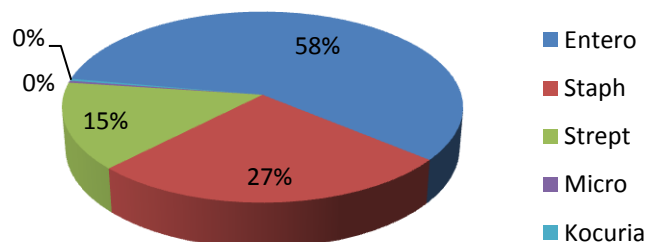
Município de Fundão

## Gráficos de prevalência de bactérias

### Prevalência de Gram -



### Prevalência de Gram +



## Perfis completos de resistência de bactérias

Perfil completo de resistências de bactérias Gram negativas em mulheres

Antibiótico	Klebsiella spp			E.coli			Proteus spp			Pseudomonas spp		
	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon
Amoxicilina	128 (83%)	3 (2%)	24 (15%)	461 (43%)	580 (54%)	36 (3%)	64 (39%)	90 (54%)	11 (7%)	20 (57%)	1 (3%)	14 (4%)
Amox+Ac.Cla	20 (13%)	113 (73%)	22 (14%)	22 (2%)	1023 (95%)	32 (3%)	21 (13%)	135 (82%)	9 (5%)	23 (66%)	1 (3%)	11 (31%)
Nitrofurantoina	42 (27%)	89 (57%)	24 (16%)	31 (3%)	985 (91%)	61 (6%)	125 (76%)	24 (14%)	16 (10%)	19 (54%)	0 (0%)	16 (46%)
Norfloxacina	25 (16%)	107 (69%)	23 (15%)	204 (19%)	797 (74%)	76 (7%)	19 (11%)	133 (81%)	13 (8%)	9 (26%)	9 (26%)	17 (48%)
Ciprofloxacina	25 (16%)	78 (50%)	52 (34%)	153 (14%)	574 (53%)	350 (33%)	19 (11%)	94 (57%)	52 (32%)	9 (26%)	13 (37%)	13 (37%)
Trim/Sul	30 (19%)	102 (66%)	23 (15%)	280 (26%)	754 (70%)	43 (4%)	41 (25%)	114 (69%)	10 (6%)	25 (71%)	0 (0%)	10 (29%)

Perfil completo de resistências de bactérias Gram negativas em mulheres

Antibiótico	Acinetobacter baumannii			Enterobacter spp			Citrobacter spp		
	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon
Amoxicilina	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)
Amox+Ac.Cla	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (67%)	1 (33%)	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)
Nitrofurantoina	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (67%)	0 (0%)	1 (33%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)
Norfloxacina	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33%)	2 (67%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)
Ciprofloxacina	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)
Trim/Sul	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (67%)	1 (33%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)

Perfil completo de resistências de bactérias Gram positivas em mulheres

Antibiótico	Enterococcus spp			Staphylococcus spp			Streptococcus spp		
	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon
Amoxicilina	6 (5%)	121 (92%)	4 (3%)	6 (12%)	44 (86%)	1 (2%)	2 (5%)	35 (95%)	0 (0%)
Amox+Ac.Cla	2 (2%)	126 (96%)	3 (2%)	0 (0%)	49 (96%)	2 (4%)	1 (3%)	35 (94%)	1 (3%)
Nitrofurantoina	5 (4%)	110 (84%)	16 (12%)	3 (6%)	46 (90%)	2 (4%)	1 (3%)	31 (84%)	5 (13%)
Norfloxacina	24 (18%)	87 (67%)	20 (15%)	18 (35%)	26 (51%)	7 (14%)	10 (27%)	21 (57%)	6 (16%)
Ciprofloxacina	10 (8%)	74 (56%)	47 (36%)	7 (14%)	23 (45%)	21 (41%)	4 (11%)	15 (40%)	18 (49%)
Trim/Sul	24 (18%)	99 (76%)	8 (6%)	9 (18%)	41 (80%)	1 (2%)	15 (40%)	18 (49%)	4 (11%)



Perfil completo de resistências de bactérias Gram positivas em mulheres						
Antibiótico	Micrococcus spp			Kocuria spp		
	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon
Amoxicilina	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
Amox+Ac.Cla	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
Nitrofurantoína	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
Norfloxacina	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
Ciprofloxacina	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
Trim/Sul	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)

Perfil completo de resistências de bactérias Gram negativas em homens												
Antibiótico	Klebsiella spp			E.coli			Proteus spp			Pseudomonas spp		
	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon
Amoxicilina	40 (77%)	0 (0%)	12 (23%)	77 (49%)	77 (49%)	3 (2%)	39 (48%)	32 (40%)	10 (12%)	16 (59%)	0 (0%)	11 (41%)
Amox+Ac.Cla	14 (27%)	25 (48%)	13 (25%)	7 (4%)	144 (92%)	6 (4%)	27 (33%)	46 (57%)	8 (10%)	20 (74%)	0 (0%)	7 (26%)
Nitrofurantoína	20 (38%)	17 (33%)	15 (29%)	9 (6%)	140 (89%)	8 (5%)	59 (73%)	11 (14%)	11 (13%)	15 (56%)	0 (0%)	12 (44%)
Norfloxacina	14 (27%)	22 (42%)	16 (31%)	58 (37%)	91 (58%)	8 (5%)	26 (32%)	45 (56%)	10 (12%)	8 (29%)	8 (30%)	11 (41%)
Ciprofloxacina	14 (27%)	18 (35%)	20 (38%)	42 (27%)	70 (44%)	45 (29%)	21 (26%)	31 (38%)	29 (36%)	9 (33%)	7 (26%)	11 (41%)
Trim/Sul	15 (29%)	24 (46%)	13 (25%)	54 (34%)	97 (62%)	6 (4%)	24 (30%)	47 (58%)	10 (12%)	19 (70%)	1 (4%)	7 (26%)

Perfil completo de resistências de bactérias Gram negativas em homens			
Antibiótico	Acinetobacter baumannii		
	Res	Sus+Int	Incon
Amoxicilina	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Amox+Ac.Cla	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Nitrofurantoína	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Norfloxacina	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Ciprofloxacina	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Trim/Sul	2 (67%)	1 (33%)	0 (0%)

Perfil completo de resistências de bactérias Gram positivas em homens									
Antibiótico	Enterococcus spp			Staphylococcus spp			Streptococcus spp		
	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon
Amoxicilina	4 (10%)	35 (90%)	0 (0%)	7 (27%)	17 (65%)	2 (8%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)
Amox+Ac.Cla	2 (5%)	37 (95%)	0 (0%)	5 (19%)	19 (73%)	2 (8%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)
Nitrofurantoína	3 (8%)	31 (79%)	5 (13%)	3 (12%)	20 (77%)	3 (11%)	0 (0%)	5 (83%)	1 (17%)
Norfloxacina	18 (46%)	18 (46%)	3 (8%)	14 (54%)	8 (31%)	4 (15%)	2 (33%)	3 (50%)	1 (17%)
Ciprofloxacina	13 (33%)	15 (39%)	11 (28%)	12 (46%)	3 (12%)	11 (42%)	0 (0%)	3 (50%)	3 (50%)
Trim/Sul	10 (26%)	24 (61%)	5 (13%)	4 (15%)	20 (77%)	2 (8%)	2 (33%)	3 (50%)	1 (17%)



## Perfis completos de resistência de bactérias multirresistentes

Perfil completo de resistências de bactérias Gram negativas multirresistentes em mulheres												
Antibiótico	Klebsiella spp			E.coli			Proteus spp			Pseudomonas spp		
	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon
Amoxicilina	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	17 (94%)	0 (0%)	1 (6%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (90%)	0 (0%)	1 (10%)
Amox+Ac.Cla	4 (20%)	15 (75%)	1 (5%)	5 (28%)	12 (67%)	1 (5%)	5 (83%)	1 (17%)	0 (0%)	9 (90%)	0 (0%)	1 (10%)
Cefotaxima	13 (65%)	4 (20%)	3 (15%)	13 (72%)	3 (17%)	2 (2%)	1 (17%)	3 (50%)	2 (33%)	5 (50%)	2 (20%)	3 (30%)
Ceftazidima	10 (50%)	8 (40%)	2 (10%)	8 (44%)	9 (50%)	1 (6%)	1 (16%)	4 (67%)	1 (17%)	2 (20%)	7 (70%)	1 (10%)
Imipenem	0 (0%)	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	18 (100%)	0 (0%)	1 (17%)	5 (83%)	0 (0%)	3 (30%)	6 (60%)	1 (10%)
Meropenem	0 (0%)	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	17 (94%)	1 (6%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	3 (30%)	5 (50%)	2 (20%)
Norfloxacin	18 (90%)	0 (0%)	2 (10%)	17 (94%)	0 (0%)	1 (6%)	5 (83%)	1 (17%)	0 (0%)	7 (70%)	1 (10%)	2 (20%)
Ciprofloxacina	19 (95%)	0 (0%)	1 (5%)	17 (94%)	0 (0%)	1 (6%)	4 (67%)	1 (17%)	1 (16%)	8 (80%)	1 (10%)	1 (10%)
Gentamicina	11 (55%)	5 (25%)	4 (20%)	11 (61%)	2 (11%)	5 (28%)	0 (0%)	4 (67%)	2 (33%)	4 (40%)	3 (30%)	3 (30%)
Trim/Sul	19 (95%)	0 (0%)	1 (5%)	13 (72%)	4 (22%)	1 (6%)	4 (67%)	1 (17%)	1 (16%)	9 (90%)	0 (0%)	1 (10%)
Nitrofurantoína	13 (65%)	5 (25%)	2 (10%)	0 (0%)	18 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (90%)	0 (0%)	1 (10%)

Perfil completo de resistências de bactérias Gram negativas multirresistentes em homens												
Antibiótico	Klebsiella spp			E.coli			Proteus spp			Pseudomonas spp		
	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon
Amoxicilina	12 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Amox+Ac.Cla	6 (50%)	5 (42%)	1 (8%)	1 (33%)	2 (67%)	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Cefotaxima	8 (67%)	1 (8%)	3 (25%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (57%)	3 (43%)	0 (0%)	5 (71%)	0 (0%)	2 (29%)
Ceftazidima	7 (59%)	4 (33%)	1 (8%)	2 (67%)	1 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	2 (29%)	4 (57%)	1 (14%)
Imipenem	0 (0%)	12 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	1 (14%)	6 (86%)	0 (0%)	1 (14%)	6 (86%)	0 (0%)
Meropenem	1 (9%)	10 (83%)	1 (8%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	1 (14%)	4 (57%)	2 (29%)	1 (14%)	4 (57%)	2 (29%)
Norfloxacin	9 (75%)	0 (0%)	3 (25%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (86%)	1 (14%)	0 (0%)	5 (71%)	0 (0%)	2 (29%)
Ciprofloxacina	10 (83%)	1 (9%)	1 (8%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (72%)	1 (14%)	1 (14%)	5 (72%)	1 (14%)	1 (14%)
Gentamicina	3 (25%)	7 (58%)	2 (17%)	2 (67%)	1 (33%)	0 (0%)	3 (43%)	3 (43%)	1 (14%)	5 (71%)	2 (29%)	0 (0%)
Trim/Sul	10 (83%)	2 (17%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (71%)	2 (29%)	0 (0%)	6 (86%)	0 (0%)	1 (14%)
Nitrofurantoína	9 (75%)	1 (8%)	2 (17%)	1 (33%)	2 (67%)	0 (0%)	6 (86%)	1 (14%)	0 (0%)	6 (86%)	0 (0%)	1 (14%)

Perfil completo de resistências de bactérias Gram positivas multirresistentes em homens									
Antibiótico	Enterococcus spp			Staphylococcus spp			Streptococcus spp		
	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon	Res	Sus+Int	Incon
Amoxicilina	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)
Amox+Ac.Cla	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)
Cefotaxima	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	0(0%)	1 (50%)	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ceftazidima	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	0(0%)	1 (50%)	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)
Imipenem	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0(0%)	0(0%)	2 (100%)	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)
Meropenem	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0(0%)	0(0%)	2 (100%)	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)
Norfloxacin	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	0(0%)	1 (50%)	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ciprofloxacina	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	0(0%)	1 (50%)	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)
Gentamicina	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (50%)	0(0%)	1 (50%)	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)
Trim/Sul	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	0(0%)	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)
Nitrofurantoína	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	0(0%)	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)







# **U. PORTO**



**FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO**

## **Relatório de estágio do Mestrado em Análises Clínicas**

**Laboratório Hemobiolab**

***Realizado por:***

Tiago Jorge Dias Farinha

***Orientadora:***

Dr<sup>a</sup> Ana Sofia Clemente Jorge

Porto

2012



# Índice

<b>Bioquímica Clínica</b> .....	<b>11</b>
1. Controlo de Qualidade.....	12
2. Equipamentos e Princípios de Instrumentação .....	13
3. Parâmetros Bioquímicos .....	18
3.1. Soro/Plasma.....	18
3.1.1. Hidratos de Carbono .....	18
3.1.1.1. Glucose.....	18
3.1.1.2. Prova de Tolerância à Glucose .....	19
3.1.2. Compostos Nitrogenados Proteicos .....	19
3.1.2.1. Proteínas Totais.....	19
3.1.2.2. Albumina.....	20
3.1.2.3. Transferrina .....	20
3.1.2.4. Ferritina.....	21
3.1.2.5. Capacidade Total de Fixação do Ferro .....	21
3.1.2.6. Eletroforese das Proteínas.....	22
3.1.3. Compostos Nitrogenados não Proteicos .....	23
3.1.3.1. Ureia .....	23
3.1.3.2. Ácido Úrico .....	23
3.1.3.3. Creatinina .....	24
3.1.3.4. Determinação da Depuração da Creatinina .....	24

3.1.4. Enzimas .....	25
3.1.4.1. Aspartato Aminotransferase .....	25
3.1.4.2. Alanina Aminotransferase .....	25
3.1.4.3. Gama Glutamil Aminotransferase .....	26
3.1.4.4. Creatina Quinase .....	26
3.1.4.5. Lactato Desidrogenase Láctica .....	27
3.1.4.6. Fosfatase Alcalina .....	27
3.1.4.7. $\alpha$ - Amilase.....	28
3.1.5. Lípidos e Lipoproteínas .....	29
3.1.5.1. Triglicéridos .....	29
3.1.5.1. Colesterol.....	29
3.1.5.1. Colesterol HDL.....	30
3.1.5.1. Colesterol LDL .....	30
3.1.5.1. Apolipoproteína A-1 .....	31
3.1.5.1. Apolipoproteína B.....	31
3.1.6. Bilirrubinas e Ácidos Biliares .....	32
3.1.6.1. Bilirrubinas (Total e Direta).....	32
3.1.7. Eletrólitos .....	33
3.1.7.1. Cloreto .....	33
3.1.7.2. Sódio .....	33
3.1.7.3. Potássio .....	34
3.1.8. Iões Inorgânicos.....	34
3.1.8.1. Cálcio Total.....	34



3.1.8.2. Fósforo.....	35
3.1.8.3. Magnésio .....	35
3.1.8.4. Ferro .....	36
3.2. Sangue Total .....	37
3.2.1. Hemoglobina glicada.....	37
3.3. Urina.....	37
3.3.1. Análise Sumária à Urina.....	37
3.3.1.1. Contagem ou Prova de Addis .....	38
3.3.2. Pesquisa de Drogas de Abuso .....	39
3.3.3. Pesquisa de Proteína de Bence Jones.....	39
3.3.4. Determinações quantitativas .....	39
3.3.5. Proteínas Totais na Urina.....	42
3.4. Fezes .....	43
3.4.1. Pesquisa de Sangue Oculto .....	43
3.5. Líquido Seminal.....	43
3.5.1. Espermograma.....	43
<b>Hematologia .....</b>	<b>45</b>
4. Controlo de Qualidade em Hematologia .....	45
5. Equipamentos .....	46
6. Citologia das Células Sanguíneas .....	51
6.1. Hemograma.....	51
6.2. Estudo Morfológico do Sangue Periférico .....	51

6.3. Reticulócitos .....	53
7. Citoquímica das Células Sanguíneas .....	53
7.1. Mieloperoxidase/ Sudão Negro B .....	53
8. Físico-química das Células Sanguíneas .....	54
8.1. Velocidade de Sedimentação .....	54
8.2. Pesquisa de Células Falciformes .....	54
9. Estudos de Hemostase .....	55
9.1. Tempo de Protrombina .....	56
9.2. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado .....	56
9.3. Fibrinogénio.....	57
10. Imunohematologia .....	57
10.1. Grupos Sanguíneos Eritrocitários .....	58
10.1.1. Sistema ABO.....	58
10.1.2. Sistema Rhesus .....	58
10.2. Teste de Coombs .....	60
10.2.1. Teste de Coombs Direto.....	60
10.2.2. Teste de Coombs Indireto .....	63
<b>Imunologia e Endocrinologia .....</b>	<b>65</b>
11. Controlo de Qualidade em Imunologia e Endocrinologia. ....	65
12. Equipamentos e Princípios de Instrumentação .....	66
13. Imunologia.....	68
13.1. Imunoquímica .....	68

13.1.1. Doseamento de Imunoglobulinas .....	68
13.1.1.1. Imunoglobulina A .....	68
13.1.1.2. Imunoglobulina G .....	69
13.1.1.3. Imunoglobulina M.....	69
13.1.2. Estudos do Complemento .....	70
13.1.2.1. Complemento C <sub>3</sub> .....	70
13.1.2.2. Complemento C <sub>4</sub> .....	71
13.1.3. Proteína C Reativa .....	71
13.1.4. α1 - Antitripsina .....	72
13.1.5. β <sub>2</sub> - Microglobulina.....	73
13.1.6. Fator Reumatóide.....	73
13.2. Autoimunidade.....	74
13.2.1. Anticorpos Antinucleares .....	74
13.2.2. Anticorpos Anti - Sm.....	75
13.2.3. Anticorpos Anti - nRNP .....	75
13.2.4. Anticorpos Anti - SS-A/Ro e SS-B/La .....	75
13.2.5. Anticorpos Anti Scl 70 .....	76
13.2.6. Anticorpos Anti Jo 1 .....	76
13.2.7. Anticorpos Anti dsDNA .....	76
13.2.8. ENA.....	77
13.2.9. Anticorpos Anti - Tiroglobulina.....	77
13.2.10. Anticorpos Anti - Peroxidase .....	78
13.3. Imunoserologia .....	78

13.3.1. Hudlesson .....	78
13.3.2. Paul Bunnel.....	78
13.3.3. Anticorpo anti streptolisina O.....	79
13.3.4. VDRL .....	79
13.3.5. TPHA .....	80
13.3.6. Weil - Félix .....	81
13.3.7. Widal .....	81
13.3.8. Waller Rose.....	81
13.3.9. Anticorpos Anti - Toxoplasmose (IgM e IgG) .....	82
13.3.10. Anticorpos Anti - Rubéola (IgM e IgG) .....	82
13.3.11. Anticorpos Anti - CMV (IgM e IgG) .....	83
13.3.12. HIV 1/2 .....	84
13.3.13. Hepatite A .....	85
13.3.13.1. Anticorpo Anti – HAV Total.....	85
13.3.13.2. Anticorpo Anti – HAV IgM.....	86
13.3.14. Hepatite B .....	87
13.3.14.1. Antígeno HBs .....	87
13.3.14.2. Anticorpo anti HBs .....	88
13.3.14.3. Anticorpo anti HBc IgM.....	89
13.3.14.4. Anticorpos Totais anti HBc .....	89
13.3.14.5. Antígeno HBe .....	90
13.3.14.6. Anticorpo HBe.....	91
13.3.15. Hepatite C .....	92

13.4. Imunoalergologia .....	93
13.4.1. Imunoglobulina E.....	93
13.4.2. AlaTOP .....	93
14. Endocrinologia.....	94
14.1. Hormonas Sexuais e Gonadotrofinas .....	94
14.1.1. FSH.....	94
14.1.2. LH .....	95
14.1.3. Estradiol .....	96
14.1.3. Progesterona.....	97
14.1.3. Prolactina .....	98
14.1.3. HCG .....	98
14.2. Função Tiroidea.....	99
14.2.1. TSH.....	99
14.2.1. T <sub>4</sub> .....	100
14.2.1. FT <sub>4</sub> .....	101
14.2.1. T <sub>3</sub> .....	101
14.2.1. FT <sub>3</sub> .....	102
14.2.1. Tiroglobulina.....	103
14.3. Marcadores Tumoriais.....	104
14.3.1. PSA total .....	104
14.3.2. PSA livre .....	105
14.3.3. CA 125.....	105
14.3.4. CA 19-9.....	107

14.3.5. CA 15.3 .....	108
14.3.6. CEA.....	108
14.3.7. Alfa Fetoproteína.....	109
<b>Microbiologia .....</b>	<b>111</b>
15. Controlo de Qualidade em Microbiologia .....	111
16. Equipamentos .....	112
17. Meios de Cultura .....	113
18. Métodos de Coloração e Testes de Identificação .....	116
18.1. Coloração de Gram .....	116
18.1.1. Reagentes.....	116
18.1.2. Procedimento .....	117
18.2. Coloração de Kinyoun .....	117
18.2.1. Reagentes.....	117
18.2.2. Procedimento .....	118
18.3. Métodos de Concentração de Parasitas nas Fezes .....	118
18.3.1. Flutuação em Solução Saturada de Cloreto de Sódio .....	118
18.3.2. Centrifugo-Sedimentação pela Formalina-Éter .....	119
18.4. Teste da Coagulase.....	119
18.4.1. Teste da Coagulase em lâmina .....	120
18.4.2. Teste da Coagulase em tubo .....	120
18.5. Teste da Catalase .....	121
18.5. Teste da Oxidase .....	121

18.5. Teste da Filamentação .....	122
19. Produtos biológicos e Parâmetros analíticos .....	123
19.1. Aparelho Urinário.....	123
19.1.1. Urina Assética .....	123
19.1.1.1. Exame Bacteriológico .....	123
19.1.1.2. Exame Micológico .....	124
19.1.1.3. Exame Parasitológico .....	124
19.1.1.4. Pesquisa de BK .....	124
19.2. Aparelho Gastrointestinal .....	124
19.2.1. Fezes .....	124
19.2.1.1. Exame Bacteriológico .....	124
19.2.1.2. Exame Micológico .....	125
19.2.1.3. Exame Parasitológico .....	125
19.3. Aparelho Respiratório Superior.....	125
19.3.1. Exsudado Orofaríngeo .....	126
19.3.1.1. Exame Bacteriológico .....	126
19.3.2. Exsudado Nasofaríngeo .....	127
19.3.2.1. Exame Bacteriológico .....	127
19.4. Aparelho Respiratório Inferior .....	127
19.4.1. Exame Bacteriológico.....	128
19.4.2. Pesquisa de BK.....	128
19.5. Aparelho Genital.....	128
19.5.1. Exsudado Vaginal .....	129

19.5.1.1. Exame Bacteriológico .....	129
19.5.1.2. Exame Micológico .....	130
19.5.1.3. Exame Parasitológico .....	130
19.5.2. Exsudado Uretral Masculino .....	130
19.5.2.1. Exame Bacteriológico .....	130
19.5.2.2. Exame Micológico .....	131
19.5.2.3. Exame Parasitológico .....	131
19.5.3. Espermocultura .....	131
19.6. Exsudados Auriculares .....	132
19.6.1. Exame Bacteriológico .....	132
19.6.2. Exame Micológico .....	133
19.7. Exsudado Ocular .....	133
19.7.1. Exame Bacteriológico .....	133
19.7.2. Exame Micológico .....	134
19.8. Exsudados Purulentos .....	134
19.8.1. Exame Bacteriológico .....	134
19.8.2. Exame Micológico .....	135
20. Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos .....	135
21. Bibliografia .....	136



## **Relatório de Estágio**

O Hemobiolab é um laboratório privado de Análises Clínicas sediado em Castelo Branco e com inúmeros postos de colheitas situados um pouco por toda a região da Beira Interior Sul. É um laboratório de média dimensão certificado pela norma NP EN ISO 9001:2008 e que apresenta as valências de Bioquímica Clínica, Hematologia, Imunologia - Endocrinologia e também a valência de Microbiologia. Atualmente, o laboratório situa-se na Quinta da Milhã sendo parte integrante do Centro Médico de Castelo Branco.

O estagiário efetuou estágio curricular no laboratório Hemobiolab entre Fevereiro de 2012 a Abril de 2012, sob a orientação da sua diretora técnica Dr. Ana Sofia Jorge, licenciada em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de Coimbra e especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos.

Servindo de apoio á direção técnica encontra-se um grupo de trabalho composto por vários profissionais na área das Análises Clínicas, especialistas e técnicos que auxiliam a execução de métodos e técnicas analíticas.

Este relatório não pretende, de forma alguma, ser uma descrição exaustiva do trabalho realizado, mas sim referir, em termos gerais, a experiência adquirida no contacto com as técnicas, os métodos, os conceitos e os principais meios usados, de forma a desenvolver as competências e o espírito crítico fundamentais nas diversas valências do laboratório.

### **Bioquímica Clínica**

A Bioquímica Clínica é uma das valências mais importante nos laboratórios de análises clínicas uma vez que monitoriza/doseia compostos e pequenas moléculas biológicas numa interação mútua entre a química e a patologia. É portanto, uma valência que no laboratório abrange um vasto número e enorme diversidade de parâmetros analíticos. Como tal, torna-se fundamental a aposta em novas tecnologias e sistemas de automação, com vista a dar uma resposta adequada ao rigor, reprodutibilidade e produtividade que o crescente volume de análises processadas requer.

Ao iniciar funções nesta valência teve a possibilidade de acompanhar as várias fases do processo laboratorial: fase pré-analítica (triagem através do sistema de

identificação de amostras por códigos de barras, tratamento, preparação para análise e conservação das amostras biológicas), analítica (acompanhamento e manutenção de técnicas bioquímicas, estudo de novas metodologias, execução e validação analítica das análises bioquímicas efetuadas no laboratório) e fase pós-analítica em que acompanhou, com a sua orientadora, a validação biopatológica, colaborando no estudo de situações analíticas, no contacto com os clínicos para o esclarecimento de situações relacionadas com os utentes.

## **1. Controlo de Qualidade**

A melhoria contínua dos processos envolvidos deve representar o foco principal de qualquer laboratório. O Hemobiolab, como laboratório certificado, tem um programa de Controlo de Qualidade Interno e participa no Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Bioquímica Clínica do INSA Dr. Ricardo Jorge.

O Programa de Avaliação Externa da Qualidade permite ao Hemobiolab, de uma forma periódica, a avaliação do seu desempenho em termos de exatidão para as várias valências que o laboratório possui.

O Programa de Controlo de Qualidade Interno é uma ferramenta indispensável na monitorização da qualidade analítica dos resultados de um laboratório, permitindo, entre outras coisas, avaliar o grau de precisão das diferentes técnicas montadas. O grau de confiança nos resultados está dependente de um controlo de qualidade interno implementado corretamente. O laboratório Hemobiolab utiliza, na área da Bioquímica Clínica, controlos fornecidos pelas casas comerciais dos aparelhos. Os dados são registados e analisados diariamente com base nas cartas de controlo apresentadas pelo *software* dos equipamentos.

A aceitação dos resultados do Controlo Interno segue as regras propostas por Levey-Jennings, em que se aceita XX, quando se viola a regra  $1_{2s}$  está-se em situação de alerta mas não implica a rejeição da série. Quando se viola a regra  $1_{3s}$  a série é rejeitada. Quando uma série é rejeitada, repete-se a sua execução. Em caso de prevalecer a sua não conformidade, deve-se efetuar a calibração do(s) parâmetro(s) em causa, seguida de uma nova série de controlo. Se a nova série de controlo continuar a não obedecer às regras anteriores, contacta-se a assistência técnica.

## 2. Equipamentos e Princípios de Instrumentação

O atual tempo de resposta e eficácia de um laboratório podem ser melhorados através de uma gestão adequada de todos os recursos envolvidos. Assim, nos dias de hoje, é fundamental a integração entre os recursos humanos e a automação, de forma a otimizar a prestação de cuidados de saúde, contribuindo para a satisfação do utente e para a rentabilização do funcionamento do serviço.

Na área da Bioquímica Clínica, o Hemobiolab possui os seguintes equipamentos:

- **ADVIA WorkCell CDX** (Fig.1)



**Figura 1 - ADVIA Workcell CDX**

Este aparelho consiste num sistema automatizado que permite a integração de várias tarefas do trabalho laboratorial num processo contínuo. É constituído por um gestor de amostras (*Sample Manager*), um manipulador/braço mecânico, um módulo descapsulador de tubos (Decapper) e uma cadeia de transporte e distribuição de amostras onde estão conectados os diferentes equipamentos analíticos que compõem as valências de Bioquímica Clínica e Imunologia-Endocrinologia.

Após a centrifugação, triagem e identificação por códigos de barras, os tubos contendo as amostras são colocadas no *Sample Manager*, nos suportes específicos para a entrada de amostras capsuladas ou descapsuladas. O braço mecânico coloca individualmente cada tubo na cadeia de transporte de amostras. Caso os tubos se encontrem capsulados, passam primeiro pelo descapsulador. Após este processo, todos os tubos são distribuídos pelos diversos equipamentos analíticos de forma a serem processadas as análises requeridas pelo clínico.

Depois de todas as amostras serem analisadas pelos vários aparelhos que se encontram ligados á cadeia de transporte, estas regressam ao *Sample Manager*, onde os tubos são organizados e arquivados em suportes específicos. Estes suportes são

colocados num refrigerador e armazenados durante uma semana, caso seja necessário proceder a uma repetição de qualquer parâmetro bioquímico, este apresenta uma posição exata.

- **ADVIA 1800** (Fig. 2)



**Figura 2 - ADVIA 1800**

Aparelho usado em química clínica que utiliza soro, plasma ou LCR como amostra, realiza análise fotométrica com base em ensaios colorimétricos no sistema bioquímico e ensaios com eletrodo seletivo de íões de Na, K e Cl (*Ion Selective Electrode*).

Análise fotométrica:

Os reagentes são aspirados e distribuídos em cuvettes no prato de reação. A amostra é aspirada e distribuída em cuvettes no prato de diluição. Depois de diluída, a amostra é distribuída nas cuvettes de reação, onde já se encontram os reagentes. A amostra diluída restante na cuvette de diluição pode ser utilizada para testes adicionais de um pedido, repetições de ensaios, novas diluições ou testes reflexos. A reação ocorre durante o tempo designado para o ensaio e a concentração do analito é determinada por espectrofotometria.

*Ion Selective Electrode (ISE):*

A amostra é misturada com o tampão ISE, fornecendo assim um pH e força iônica constantes. À medida que a amostra tamponada é movida através do eletrodo seletivo para os íões, ocorrem alterações ao potencial elétrico. Estas alterações são comparadas com o potencial do eletrodo de referência para determinar o valor análogo correto da amostra.

- **ADVIA Centaur XP** (Fig.3)

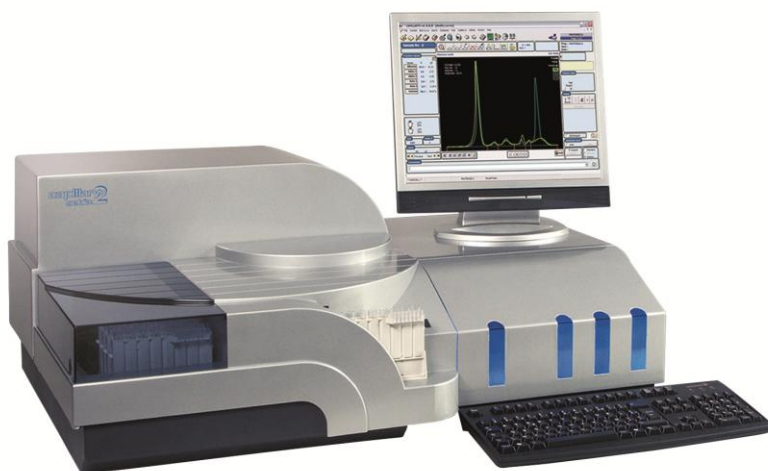


**Figura 3 - ADVIA Centaur XP**

Este aparelho é utilizado para processar amostras tanto na valência de bioquímica clínica como na valência de imunologia e endocrinologia uma vez que realiza processos enzimáticos de imunoensaios através de quimioluminescência, no entanto é muito mais utilizado na área de imunologia e endocrinologia.

Neste caso, o tubo contendo a amostra, proveniente da cadeia de transporte, entra no equipamento e é-lhe retirada uma porção para uma cuvette de reação. Aí irá ocorrer os fenómenos de incubação, em que o anel de incubação desloca a cuvette que contém partículas magnéticas revestidas por anticorpos ou antigénios, para as diferentes sondas que depositam a amostra, reagentes auxiliares e reagente primário. Nesta fase, as partículas magnéticas revestidas formam ligações com o analito (imunocomplexos). Na fase de lavagem o anel de incubação desloca a cuvette para a estação de lavagem, onde as partículas magnéticas são puxadas para o lado por ímanes e, posteriormente lavadas de forma a remover reagentes e amostra não ligados. O desenvolvimento do sinal é a última fase do processo analítico em que o anel de incubação desloca a cuvette para o luminómetro após nela ter sido dispensado reagente ácido. O luminómetro possui um tubo fotomultiplicador com contagem eletrónica de fótons e uma sonda de reagente básico. Quando o reagente básico é distribuído na cuvette, ocorre a reacção quimioluminescente. A quantidade de luz emitida é detetada pelo tubo fotomultiplicador, sendo proporcional à quantidade do analito presente na amostra. O laboratório Hemobiolab possui dois aparelhos ADVIA Centaur XP.

- **Capillarys 2** (Fig. 4)



**Figura 4 - Capillarys 2**

Este aparelho apresenta um sistema automatizado para electroforese capilar que utiliza 8 tubos capilares de sílica para múltiplas separações, sem manipulação, a alta velocidade. Permite realizar automaticamente todas as sequências da electroforese.

Neste tipo de electroforese, o uso de capilares com diâmetros internos extremamente pequenos permite uma melhor dissipação do calor e, assim, é possível obter uma alta eficiência de separação com tempo reduzido de análise. Devido à sua alta resolução, a electroforese capilar permite a separação de bandas pouco visíveis no método convencional, como os picos de Beta1 (transferrina e hemopexina) e Beta2 (complemento C3), resultando num padrão de seis bandas. Estas características permitem ganho adicional na avaliação de pacientes com gamopatias monoclonais.

Desta forma, o Capillarys 2 permite efetuar a separação das principais proteínas normais em seis frações: albumina, alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 e gama globulinas. A técnica tem esta denominação devido ao facto utilizar tubos capilares que, juntamente com os reservatórios contendo os eléctrodos, estão cheios com um tampão alcalino, o qual conduz a corrente elétrica e fornece a capacidade tamponante. A amostra é injetada no capilar pelo lado do ânodo e, sob a influência dos fluxos eletro-osmótico e eletroforético que são gerados quando o campo elétrico é aplicado, as espécies proteicas migram em direção ao cátodo. A detecção ocorre por espectrofotometria a 200 nm. O Capillarys 2 possui um sistema informático que permite a exibição, revisão e edição de resultados, propondo hipóteses para interpretação dos mesmos.

- **HA – 8160** (Fig. 5)



**Figura 5 - HA 8160**

O HA – 8160 é um analisador automático utilizado para o doseamento de HbA1c por *High Performance/Pressure Liquid Chromatography* (HPLC), permitindo também obter resultados para HbA1, HbA2 e HbF. Os níveis de HbA1c estão condicionados pela vida média dos eritrócitos e pelo valor da glicémia. Desta forma, o seu doseamento traduz os valores da glicémia ao longo das seis a oito semanas anteriores, sendo útil no controlo da diabetes. O laboratório encontra-se equipado com dois aparelhos HA – 8160 na valência de Hematologia.

O método utilizado por este aparelho baseia-se na separação das hemoglobinas por cromatografia de troca catiónica em fase reversa. Para isso, usa-se uma resina de troca iónica (fase estacionária), tendo em conta as diferentes cargas das moléculas de hemoglobina presentes na amostra (fase móvel). As respetivas absorvâncias são determinadas por espectrofotometria, permitindo calcular as percentagens das diferentes hemoglobinas glicosiladas presentes na solução separada.

- **AUTION MAX AX-4280** (Fig. 6)



**Figura 6 - AUTION MAX AX-4280**

Este equipamento automático é destinado a realizar a análise sumária da urina (Urina tipo II), sendo portanto a amostra deste aparelho. O equipamento dispensa volumes certos de urina em tiras teste URIFLET S, de forma a analisar os seguintes parâmetros: Cor, pH, Densidade, Turvação, Glucose (GLU), Proteínas (PRO), Bilirrubina (BIL), Urobilinogénio (URO), Corpos cetónicos (KET), Nitritos (NIT), Hemoglobina (BLD) e Leucócitos (LEU).

### **3. Parâmetros bioquímicos**

#### **3.1 Soro/Plasma**

##### **3.1.1 Hidratos de Carbono**

##### **3.1.1.1. Glucose (Glicose)**

**Nota:** A glicose é o principal monossacárido presente no sangue sendo formada a partir da degradação de carboidratos e conversão do glicogénio pelo fígado (1). É um substrato fornecedor de energia indispensável para o funcionamento celular.

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Hexoquinase glicose II (GLUH) é um método enzimático que utiliza as enzimas hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase. A glicose é fosforilada pela adenosina trifosfato (ATP) na presença da hexoquinase. A glicose-6-fosfato que se



forma é oxidada na presença da glicose-6-fosfato desidrogenase, originando a redução da NAD a NADH. A absorvância da NADH é medida como uma reação de ponto final a 340/410 nm. O método hexoquinase glucose II (GLUH) para sistemas bioquímicos ADVIA é um reagente de dois componentes. A amostra é adicionada ao Reagente 1, que contém tampão, ATP e NAD. As leituras de absorvância da amostra no Reagente 1 são obtidas e utilizadas para corrigir as substâncias interferentes da amostra. É adicionado o Reagente 2, que inicia a conversão da glucose e o desenvolvimento da absorvância a 340/410 nm. A diferença entre a absorvância no Reagente 1 e no Reagente 2 é proporcional à concentração da glucose.

#### **3.1.1.2. Prova de Tolerância à Glucose Oral**

A Diabetes Mellitus é uma doença metabólica que resulta da elevação crônica da glicose no sangue como resultado da deficiência de insulina, resistência à insulina ou combinação das duas. O diagnóstico bioquímico é baseado nas medições da glicemia no sangue usando os valores em jejum ou após uma sobrecarga de glucose (1).

##### **• Diagnóstico de Diabetes Mellitus**

Determinação de glicemia ocasional ou em jejum e 2 horas após uma sobrecarga oral de 75g de glucose no adulto. Na criança, faz-se sobrecarga oral de 1,75g de glucose por quilograma de peso até um máximo de 75g.

##### **• Diagnóstico da Diabetes Gestacional**

Determinação da glicemia 1 hora após uma sobrecarga oral de 50g de glucose. Este teste deverá ser efetuado entre a 24ª e a 28ª semanas de gestação. Se a glicemia for igual ou superior a 140mg/dL é requerida uma prova de tolerância completa. A prova de tolerância completa consiste na determinação da glicemia em jejum e determinação de glicemias 1, 2 e 3 horas após a sobrecarga oral de 100g de glucose.

### **3.1.2 Compostos Nitrogenados Proteicos**

#### **3.1.2.1. Proteínas Totais**

**Nota:** As proteínas do plasma são sintetizadas predominantemente no fígado. No decurso de determinadas patologias as proteínas plasmáticas e a percentagem

relativa das várias frações podem alterar-se significativamente. A determinação das proteínas totais auxilia no diagnóstico e avaliação de doenças hepáticas, renais, da medula óssea e ainda metabólicas ou nutricionais (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Proteína Total II (TP) é um método colorimétrico que utiliza reagente de biureto (sulfato de cobre numa solução alcalina). As ligações peptídicas da proteína interagem com os iões de cobre, formando um complexo de cor púrpura, que é medido como uma reação de ponto final a 545 nm.

### 3.1.2.2. Albumina

**Nota:** É a proteína mais abundante no plasma, na urina e no LCR (líquido cefaloraquidiano), sendo sintetizada no fígado. A albumina tem como principais funções a manutenção da pressão oncótica do plasma sanguíneo (3).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Albumina (ALB) é um método colorimétrico que utiliza uma solução de verde de bromocresol (BCG) como corante de ligação. A albumina do soro ou plasma liga-se quantitativamente com a solução de BCG, para formar um complexo albumina-BCG, que é medido como uma reação de ponto final a 596/694 nm.

### 3.1.2.3. Transferrina

**Nota:** A transferrina é a principal proteína transportadora de ferro no plasma, sendo sintetizada fundamentalmente no fígado. É utilizada clinicamente no diagnóstico diferencial da anemia e monitorização do seu tratamento. A determinação da concentração da transferrina está estreitamente correlacionada com a determinação da capacidade total de ligação de ferro (TIBC) e é útil na avaliação geral do estado do ferro. Altos níveis de transferrina estão relacionados à capacidade do organismo lidar com infeções (1).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA ou heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Transferrina (TRF) é um método que utiliza um ensaio de imunoturbidimetria intensificada por polietileno glicol (PEG). A amostra com transferrina de origem humana é diluída de forma adequada e feita reagir com anti-soro específico para formar um precipitado que pode ser medido por turbidimetria a 596/694 nm. A concentração de transferrina na amostra é determinada pelo cálculo de uma curva padrão a partir das normas de absorvância.

#### 3.1.2.4. Ferritina

**Nota:** O ferro armazenado no organismo humano varia entre 20 e 25% e é armazenado nos tecidos sob a forma de ferritina e hemossiderina (4). A ferritina desempenha um papel significativo na absorção, armazenamento e liberação do ferro. Embora o ferro da dieta seja de fraca absorção, o corpo conserva as suas reservas de ferro cuidadosamente, reabsorvendo a maioria do ferro libertado pela decomposição dos glóbulos vermelhos. A ferritina encontra-se no soro em baixas concentrações e é diretamente proporcional às reservas de ferro do corpo (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** Ferritina é um imunoensaio do tipo *sandwich* efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos antiferritina. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo policlonal antiferritina de cabra marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal antiferritina de rato que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas. Existe uma relação direta entre a quantidade de ferritina presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### 3.1.2.5. Capacidade Total de Fixação do Ferro

**Nota:** A capacidade total de ligação de ferro indica a quantidade total de ferro, que é possível ser transportada ou mobilizável no soro do paciente, o que de forma indireta traduz o nível sérico de transferrina (2).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Capacidade total de fixação do ferro (TIBC) é um método que utiliza 2 reagentes num processo de libertação e fixação sequencial do ferro, monitorizado por espectrofotometria.

Passo 1:

- O sistema adiciona reagente R1, um tampão ácido que contém um corante com capacidade de ligação ao ferro (Cromazurol B) e ao cloreto férrico, à amostra de soro.
- O pH baixo do R1 liberta o ferro da transferrina.
- O ferro forma um complexo corado com o corante no final deste primeiro passo. O complexo corado representa tanto o ferro sérico, como o excesso de ferro já presente no R1.

Passo 2:

- Em seguida, o sistema adiciona Reagente R2, um tampão neutro.
- O pH é alterado e cria um grande aumento da afinidade da transferrina pelo ferro.
- A transferrina sérica liga-se rapidamente ao ferro, extraíndo-o do complexo corante/ferro.
- A diminuição observada na absorvância do complexo corado corante/ferro é diretamente proporcional à capacidade total de ligação do ferro na amostra de soro.

### 3.1.2.6. Electroforese das Proteínas

**Nota:** A electroforese das proteínas plasmáticas permite a separação e determinação das cinco principais frações de proteínas séricas, originando padrões que podem ser altamente específicos para algumas patologias (mieloma múltiplo, síndrome nefrótica, cirrose hepática, entre outras) (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Cappilarys 2

**Método:** Electroforese capilar

### 3.1.3. Compostos Nitrogenados Não-Proteicos

#### 3.1.3.1. Ureia

**Nota:** A ureia é um produto final da degradação das proteínas e do metabolismo dos aminoácidos. No catabolismo das proteínas, estas são degradadas em aminoácidos e desaminadas. A amónia formada neste processo é transformada em ureia no fígado, libertada para o sangue e excretada pelo rim. A determinação da ureia é um teste usado para a avaliação da função renal e taxa de filtração glomerular (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Azoto em ureia (UN) é um método enzimático que utiliza a urease e a glutamato desidrogenase. A ureia é hidrolisada na presença da água e da urease, produzindo amónia e dióxido de carbono. A amónia reage com o 2-oxoglutarato na presença da enzima glutamato desidrogenase e do NADH. A oxidação do NADH em NAD é medida como uma reação de taxa inversa a 340/410 nm.

#### 3.1.3.2. Ácido Úrico

**Nota:** O ácido úrico é um produto do catabolismo dos nucleósidos purínicos no organismo humano. É formado principalmente no fígado e a sua excreção é efetuada pelos rins mas também pelo trato intestinal, embora em menor quantidade. O doseamento deste composto é útil na avaliação da gota ou de cálculos urinários (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Ácido úrico (UA) é doseado por um método enzimático colorimétrico que utiliza a uricase e a peroxidase. O ácido úrico é convertido pela uricase em alantoína e peróxido de hidrogénio. Forma-se um complexo colorido com o peróxido de hidrogénio, 4-aminofenazona e TOOS [N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina] catalizados pela peroxidase. O nível do complexo resultante é directamente proporcional ao nível de ácido úrico na amostra. A absorvância do complexo é lida como ponto final a 545/694 nm.

### 3.1.3.3. Creatinina

**Nota:** A creatinina é sintetizada endogenamente a partir da creatina e do fosfato de creatina decorrente do metabolismo muscular, é excretada por filtração glomerular e apenas uma pequena quantidade eliminada por secreção tubular, não sendo praticamente reabsorvida. Assim a eliminação de creatinina no soro e na urina varia em função da massa corporal nas pessoas normais que varia muito pouco. A determinação da creatinina no soro e a determinação da creatinina na urina de 24 horas podem ser usadas para estimar a taxa de filtração glomerular e assim estabelecer um diagnóstico de comprometimento da função renal (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Creatinina\_2 (CREA\_2) é um método cinético com correção da velocidade do branco baseado na reação do ácido pícrico com a creatinina num meio alcalino, conforme descrito no procedimento original de Jaffe. A creatinina reage com o ácido pícrico num meio alcalino, produzindo um complexo creatinina/picrato de cor avermelhada. A velocidade de formação do complexo é medida a 505/571 nm e é proporcional à concentração de creatinina. O método CREA\_2 é uma modificação do método Jaffe que utiliza supressão da velocidade e correção da interceção. A supressão da velocidade é utilizada para minimizar a interferência da bilirrubina. Além disso, como se concluiu que as interações não específicas de proteínas de soro/plasma com este reagente produzem uma influência positiva de aproximadamente 0,3 mg/dl (26,5  $\mu$ mol/l), as medições de soro/plasma são corrigidas automaticamente através da subtração dessa mesma concentração a cada resultado.

### 3.1.3.4. Determinação da Depuração da Creatinina

**Nota:** A creatinina, sendo uma substância endógena, formada numa taxa relativamente constante pelos músculos, é a substância mais usada para avaliar a Taxa de Filtração Glomerular (2). Para efetuar esta determinação é necessário dosear a creatinina na urina, recolhida num período de tempo de 12 ou 24 horas, e no soro de colheita efetuada nesse período de tempo.

**Amostra:** Urina ou Soro

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** A depuração da creatinina é calculada pela fórmula:  $C=U/S \times V$  em que,

C → depuração de creatinina em mL/min

U → concentração da creatinina na urina em mg/dL

S → concentração da creatinina sérica em mg/dL

V → volume da urina expresso em mL/minuto

### 3.1.4. Enzimas

#### 3.1.4.1 Aspartato Aminotransferase (AST)

**Nota:** A aspartato aminotransferase pertence ao grupo das transaminases que catalisam a interconversão dos aminoácidos para os  $\alpha$ -cetoácidos correspondentes através da transferência de grupos amina. Como se encontra nos tecidos altamente metabólicos (músculo cardíaco, células musculares esqueléticas e em menor quantidade nos rins, pâncreas e eritrócitos), quando ocorre uma lesão que afeta estes tecidos, estes lisam e libertam AST no sangue elevando os níveis séricos. O grau de elevação de AST está diretamente relacionado com a quantidade de células afetadas por doença ou pela lesão (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Aspartato aminotransferase (AST) é determinada por um método cinético UV, resultando de uma adaptação do método de referência da IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*). A concentração de NADH é medida pela sua absorvância a 340/410 nm e a diminuição da taxa de absorvância é proporcional à actividade da AST. A reação é iniciada pela adição de  $\alpha$ -cetoglutarato como segundo reagente.

#### 3.1.4.2. Alanina Aminotransferase (ALT)

**Nota:** A alanina aminotransferase, tal como a AST pertence ao grupo das transaminases. Ao nível do fígado a ALT é a enzima mais específica relativamente à AST. Esta enzima é a mais eficaz para diagnosticar problemas hepatocelulares, além de permitir uma monitorização bastante exata da evolução de doenças hepáticas (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Alanina aminotransferase (ALT) é determinada por um método cinético ultra-violeta, resultando de uma adaptação do método de referência da IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*). A reação é iniciada pela adição de  $\alpha$ -cetoglutarato como segundo reagente. A concentração de NADH é medida pela sua absorvância a 340/410 nm e a diminuição da taxa de absorvância é proporcional à atividade da alanina aminotransferase.

#### 3.1.4.3. Gama Glutamil Transferase ( $\gamma$ GT)

**Nota:** A  $\gamma$ -glutamiltransferase desempenha uma função importante na transferência de aminoácidos e péptidos através das membranas celulares, participando também no metabolismo da glutatona. Como as suas maiores concentrações são encontradas no fígado e no trato biliar é útil como indicador de doença hepatobiliar. Também é utilizada como indicador de consumo prolongado de álcool (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Gama-Glutamil Transferase ( $\gamma$ GT) é um método enzimático colorimétrico. Na reação com substrato sintético (L- $\gamma$ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida), a glicilglicina atua como recetor do resíduo de  $\gamma$ -glutamil, sendo libertado 5-amino-2-nitrobenzoato (ANB). O produto libertado tem uma absorção máxima próximo do 400 nm. A taxa de formação é medida por teste fotométrico a 410/478 nm como uma reação com cinética de ordem zero.

#### 3.1.4.4. Creatina quinase (CK ou CPK)

**Nota:** O papel fisiológico da CK está associado à formação de ATP para os sistemas contrácteis ou de transporte. A concentração desta enzima no miocárdio e músculo esquelético é muito elevada, podendo ainda encontra-se quantidades apreciáveis no cérebro. A CK sérica eleva-se, quase sempre, após o enfarte agudo do miocárdio ou lesão do músculo esquelético (2). Geralmente, há aumento da enzima em miocardites



de causas variadas, rabdomiólise e esforço físico agudo. Atividades baixas de CK sérica são comuns nos idosos e em pacientes acamados (4).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Creatina quinase é doseada por um método cinético UV, resultando de uma adaptação do método de referência da IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*). A creatina quinase reage com o fosfato de creatina e a ADP, formando ATP, que é conjugada com a reação da hexoquinase-G6PD, gerando NADPH. A concentração de NADPH é medida pelo aumento de absorvância a 340/410 nm.

#### 3.1.4.5. Lactato Desidrogenase (LDH)

**Nota:** Lactato desidrogenase é uma enzima citoplasmática que catalisa a redução/oxidação reversível do piruvato a lactato usando o NADH e está presente em todas as células humanas (4). Como se distribui uniformemente por todo o organismo humano não é um indicador específico de uma doença ou lesão de um órgão. Quando as células que contêm LDH são afetadas, por doença ou lesão, sofrem lise e a enzima vai para a corrente sanguínea onde aparece em valores superiores ao normal (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Lactato Desidrogenase L–P (LDLP) é um método cinético ultravioleta. A LDH catalisa a conversão do L-lactato em piruvato na presença de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). A atividade enzimática da LD é proporcional à velocidade de produção de NADH (NAD reduzida). A quantidade de NADH produzida determinada pela medição do aumento de absorvância a 340/410 nm.

#### 3.1.4.6. Fosfatase Alcalina (ALP)

**Nota:** A Fosfatase Alcalina (ALP) é uma enzima fundamentalmente membranar presente em praticamente todos os tecidos, mas encontra-se particularmente em altas concentrações nos ossos (osteoblastos), onde se origina inicialmente, no entanto o

fígado, após a puberdade, é o principal órgão que assegura a sua produção. Normalmente é uma enzima que funciona como indicador de doenças hepáticas e ósseas (1).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Fosfatase alcalina (ALPAMP) é doseada por um método colorimétrico, resultando de uma adaptação do método de referência da IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*). A fosfatase alcalina hidrolisa o substrato pNPP formando p-nitrofenol. A reação é seguida pela medição colorimétrica da velocidade de formação do p-nitrofenol a 410/478 nm, que é proporcional à atividade da fosfatase alcalina. É utilizado um tampão de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) para manter o pH da reação entre 10,3 e 10,4. Adicionam-se iões magnésio e zinco ao tampão AMP para ativar e estabilizar a enzima.

#### 3.1.4.7. $\alpha$ -Amilase

**Nota:** A  $\alpha$ -amilase catalisa a degradação hidrolítica dos hidratos de carbono poliméricos, como a amilose, a amilopectina e o glicogénio, clivando a ligação 1,4- $\alpha$ -licosídica. Esta enzima tem origem principalmente no pâncreas (tipo-P) e glândulas salivares (tipo-S), e em muito menor quantidade nas trompas de falópio, ovário, pulmão, próstata, testículo e glândulas mamárias, lacrimais e sudoríparas. A sua eliminação é fundamentalmente renal. Elevações séricas e urinárias desta enzima são encontradas numa grande variedade de patologias (5).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** A  $\alpha$ -amilase (AMYLAS) é detetada por um método enzimático que utiliza p-nitrofenil-maltoheptaósido (G7pNP) bloqueado por etilideno como substrato. A enzima  $\alpha$ -glucosidase indicadora, utilizada para libertar o p-nitrofenol, é também empregue neste método. A glucose (G) terminal do substrato é quimicamente bloqueada, prevenindo a divisão pela enzima indicadora. O p-nitrofenol libertado é medido a 410/694 nm.

### 3.1.5. Lípidos e Lipoproteínas

#### 3.1.5.1. Triglicéridos

**Nota:** Os triglicerídeos são ésteres de glicerol com três ácidos gordos de cadeias longas. A sua função primária é armazenar e fornecer energia às células, uma parte deles é obtida na dieta e outra é sintetizada no fígado. São transportados no plasma na sua maior parte sob a forma de quilomicras e VLDL (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** É utilizado um método enzimático colorimétrico que utiliza um único reagente, de forma a quantificar o total de triglicéridos, incluindo mono e diglicéridos, e as frações livres de glicerol. Os triglicéridos são convertidos em glicerol e em ácidos gordos livres pela lipase. Em seguida, o glicerol é convertido em glicerol-3-fosfato pela glicerol quinase, seguindo-se a sua conversão pela glicerol-3-fosfato-oxidase em peróxido de hidrogénio. Um complexo corado é formado a partir do peróxido de hidrogénio, da 4-aminofenazona e do 4-clorofenol sob a influência catalítica da peroxidase. A absorvância do complexo é lida como uma reação de ponto final a 505/694 nm.

#### 3.1.5.2. Colesterol

**Nota:** O colesterol é um lípido necessário para a produção de esteróides, hormonas sexuais, ácidos biliares e membranas celulares. É sintetizado principalmente no fígado (75%) e o restante tem origem na dieta alimentar. O doseamento de colesterol é utilizado para avaliar o risco aterogénico, de enfarte do miocárdio e de perturbações do metabolismo lipídico e lipoproteico (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Colesterol (CHOL) é doseado por um método enzimático que utiliza a conversão de colesterol esterase e colesterol oxidase. Os ésteres do colesterol são hidrolizados pela colesterol esterase em colesterol e em ácidos gordos livres. O colesterol é convertido em colesterol-3-ona pela colesterol oxidase na presença de oxigénio, formando peróxido de hidrogénio. Um complexo corado é formado a partir do

peróxido de hidrogénio, da 4-aminoantipirina e do fenol sob a influência catalítica da peroxidase. A absorvância do complexo é lida como uma reação de ponto final a 505/694 nm.

#### 3.1.5.3. Colesterol HDL

**Nota:** As lipoproteínas de alta densidade (*High Density Lipoproteins*) são responsáveis pelo transporte inverso do colesterol das células periféricas para o fígado. Aqui, o colesterol é transformado em ácidos biliares, que são excretados para os intestinos através das vias biliares (1). É clinicamente importante monitorizar o colesterol HDL no soro, pois existe uma correlação inversa entre as concentrações séricas de colesterol HDL e o risco de doença aterosclerótica.

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA ou heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Colesterol HDL Direto (D-HDL) é um método enzimático colorimétrico. O método consiste em 2 fases de reação distintas:

Eliminação de quilomicras, Colesterol VLDL e Colesterol LDL por colesterol esterase e colesterol oxidase. O peróxido produzido pela oxidase é removido por catalase.

Quantificação específica do Colesterol HDL após libertação do Colesterol HDL por surfactante no Reagente 2. A catalase do passo 1 é inibida por azida sódica no Reagente 2. A intensidade do corante iminoquinona produzido na reação de Trinder é diretamente proporcional à concentração de colesterol quando medida a 596 nm.

#### 3.1.5.4. Colesterol LDL

**Nota:** As lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoproteins*) desempenham um papel fulcral na formação e desenvolvimento da aterosclerose e, especialmente, da aterosclerose coronária. As LDL são sintetizadas e eliminadas no fígado e é onde se encontra 60% a 70% do colesterol sérico total. O valor do colesterol LDL é o fator clínico de previsão mais específico para determinar o risco de cardiopatia coronária (1).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Colesterol LDL Direto (DLDL) é um método enzimático colorimétrico (direto). O método consiste em 2 fases de reação distintas:

As enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase eliminam o colesterol, exceto da lipoproteína de baixa densidade. A ação de catalase remove o peróxido produzido pela oxidase.

A quantificação específica do Colesterol LDL é efetuada após a sua libertação pelo detergente do Reagente 2. A catalase do passo 1 é inibida por azida sódica no Reagente 2. A intensidade do corante iminoquinona produzido na reação de Trinder é diretamente proporcional à concentração de colesterol quando medida a 596 nm.

#### **3.1.5.5. Apolipoproteína A-1**

**Nota:** A apolipoproteína A-1 é uma proteína de ligação de lípidos responsável por aproximadamente 90% da proteína total de lipoproteína de alta densidade (HDL) (1). A apolipoproteína A-1 fornece o componente estrutural necessário para a formação de HDL e funciona como um cofactor para a enzima lecitina colesterol-aciltransferase (LCAT) na esterificação de colesterol (4).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** APO A1 é um método imunoturbidimétrico intensificado por polietileno glicol (PEG). Uma amostra contendo apolipoproteína A-1 de origem humana e anti-soro específico forma um complexo insolúvel que pode ser medido por turbidimetria a 340/694 nm. A concentração de apolipoproteína A-1 pode ser determinada pelo cálculo de uma curva padrão a partir das normas de absorvância.

#### **3.1.5.6. Apolipoproteína B**

**Nota:** A apolipoproteína B (Apo B) é uma proteína de ligação de lípidos e o principal componente da LDL sendo importante na regulação da síntese e do metabolismo do colesterol (1). Existem duas formas desta lipoproteína: Apo B – 100 que é sintetizada no fígado e encontrada nas LDL e seus precursores e Apo – 48 de origem intestinal e

presente principalmente nas quilomicras (2). Concentrações elevadas de Apo B no plasma, é considerado como fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e cardiopatias (4).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** APO B é doseada por um método imunoturbidimétrico intensificado por polietileno glicol (PEG). Uma amostra contendo apolipoproteína B de origem humana e anti-soro específico forma um complexo insolúvel que é medido por turbidimetria a 340/694 nm. A concentração de apolipoproteína B é determinada pelo cálculo de uma curva padrão a partir das normas de absorvância.

### 3.1.6. Bilirrubinas e Ácidos Biliares

#### 3.1.6.1. Bilirrubinas (Total e Direta)

**Nota:** A bilirrubina é um composto que resulta da degradação de hemoglobina nos glóbulos vermelhos senescentes e é um produto intermediário da hemólise. Esta degradação ocorre nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea, sendo excretada na biliar e urina. A bilirrubina total no soro consiste na soma da bilirrubina indireta ou não conjugada, que se encontra ligada a proteínas, e bilirrubina direta ou conjugada, que circula no sangue livremente até chegar ao fígado onde é conjugada com a glucuronídeo transferase sendo depois excretada na biliar. A determinação da bilirrubina serve para avaliar a função hepática, anemias hemolíticas e diagnosticar icterícia e seguir a sua evolução (1).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Métodos:** Bilirrubina Total\_2 (TBIL\_2) e Bilirrubina Directa\_2 (DBIL\_2) baseiam-se num método de oxidação química que utiliza o vanadato como agente de oxidação. A bilirrubina é oxidada por vanadato com aproximadamente pH 2,9, produzindo biliverdina. Na presença do detergente e do vanadato, tanto a bilirrubina conjugada (direta), como a bilirrubina não conjugada são oxidadas. Esta reação de oxidação provoca a diminuição da densidade ótica da cor amarela que é específica da bilirrubina. A diminuição da densidade ótica a 451/545 nm é proporcional à

concentração de bilirrubina total na amostra. A concentração é medida como uma reação de ponto final.

### **3.1.7. Eletrólitos**

#### **3.1.7.1. Cloreto**

**Nota:** O cloreto é o maior anião presente no espaço extracelular. A sua importância fisiológica é manter o balanço hídrico, o equilíbrio ácido base e a neutralidade elétrica do fluido extracelular. A dosagem do cloreto não fornece muita informação isoladamente, mas com a combinação de outros eletrólitos fornece indicações sobre o equilíbrio ácido base e estado de hidratação (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** O doseamento do ião Cloreto (CL) é baseado num método potenciométrico indireto que utiliza um eletrodo seletivo para os iões (ISE). Mistura-se a amostra com o tampão ISE, fornecendo assim um pH constante e uma solução com força iônica constante. À medida que a amostra tamponada é movida através do ISE, ocorrem alterações ao potencial elétrico. Estas alterações ao potencial elétrico são comparadas com o potencial do eletrodo de referência para determinar o valor análogo correto da amostra.

#### **3.1.7.2. Sódio**

**Nota:** O sódio é o principal catião dos fluidos extracelulares, é importante na manutenção da osmolaridade, do volume do líquido extracelular, do tamanho celular e na transmissão de impulsos nervosos e musculares. Este teste é usado para avaliar o equilíbrio hidroelettrico e monitorizar a terapia (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** O doseamento do ião Sódio (Na) é baseado num método potenciométrico indireto que utiliza um eletrodo seletivo para os iões (ISE). Mistura-se a amostra com o

tampão ISE, fornecendo assim um pH constante e uma solução com força iônica constante. À medida que a amostra tamponada é movida através do ISE, ocorrem alterações ao potencial elétrico. Estas alterações ao potencial elétrico são comparadas com o potencial do eletrodo de referência para determinar o valor análogo correto da amostra.

### **3.1.7.3. Potássio**

**Nota:** O potássio é o catião de maior concentração no fluido intracelular. É excretado pelos rins e não é reabsorvido no aparelho renal, por isso se o ião potássio não for adequadamente adicionado na dieta, as suas concentrações no soro podem diminuir rapidamente. As concentrações no soro são muito pequenas (4 mEq/L) e a ocorrência de uma alteração ligeira pode ter consequências significativas. Como é muito importante na função cardíaca é usado em pacientes com uso de diuréticos e com medicação cardíaca (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** O Potássio (K) é doseado por um método potenciométrico indireto que utiliza um eletrodo seletivo para os iões (ISE). Mistura-se a amostra com o tampão ISE, fornecendo assim um pH constante e uma solução com força iônica constante. À medida que a amostra tamponada é movida através do ISE, ocorrem alterações ao potencial elétrico. Estas alterações ao potencial elétrico são comparadas com o potencial do eletrodo de referência para determinar o valor análogo correto da amostra.

### **3.1.8. Iões inorgânicos**

#### **3.1.8.1. Cálcio Total**

**Nota:** O cálcio é um dos elementos minerais mais abundantes no organismo. Desempenha um papel vital na mineralização do esqueleto, no processo da coagulação, condução neuromuscular, excitabilidade dos músculos esquelético e cardíaco, regulação de atividade enzimática, preservação da integridade e permeabilidade da membrana celular. A dosagem do cálcio sérico é usada para avaliar



a função da paratiroide e metabolismo do cálcio. Estas determinações são também usadas na monitorização de pacientes com insuficiência renal, transplante renal e várias doenças ósseas e crónicas (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Cálcio<sub>2</sub> (CA<sub>2</sub>) é um método colorimétrico que utiliza o Arsenazo III para formar um complexo estável com cálcio, de elevada seletividade, a pH baixo. Os iões de cálcio formam um complexo corado com Arsenazo III, o qual pode ser medido a 658/694 nm. A quantidade de cálcio presente na amostra é diretamente proporcional à intensidade do complexo corado formado.

### 3.1.8.2. Fósforo

**Nota:** A maior percentagem do fósforo do organismo encontra-se nos ossos sob a forma de fosfato. A maior parte do fósforo inorgânico encontra-se associado ao cálcio no esqueleto e contribui para a homeostasia elétrica e ácido base, no entanto, cerca de 15% encontra-se no sangue onde desempenha funções de síntese nos compostos fosfolipídicos das membranas celulares, como fonte de energia (ATP), ácidos nucleicos e enzimas. O seu doseamento é indicado quando há suspeita de perturbações da glândula paratiroide e do cálcio (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Fósforo inorgânico (IP) é doseado por um método colorimétrico que se baseia na formação de um complexo de absorção de UV entre o fósforo e o molibdato. O fósforo inorgânico reage com o molibdato de amónia na presença de ácido sulfúrico, para formar um complexo fosfomolibdato não reduzido, que é medido como uma reação de ponto final a 340/658 nm.

### 3.1.8.3. Magnésio

**Nota:** O magnésio é o segundo catião mais abundante no meio intracelular, sendo cofator de inúmeras enzimas. É importante em quase todos os processos metabólicos, o tecido neuronal depende do magnésio para a sua atividade, o mesmo acontece na

condução neuromuscular. Possui uma relação estreita com o metabolismo do cálcio, visto que aumenta a sua absorção intestinal. O esqueleto é a maior reserva de magnésio que fornece os *pools* intra e extracelulares. Este teste permite avaliar a deficiência ou sobrecarga de magnésio no organismo (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Magnésio (MG) é doseado por um método colorimétrico que se baseia na reação com azul de xilidil. Os íons de magnésio reagem com o azul de xilidil num meio alcalino para formar um complexo púrpura/vermelho solúvel na água. O aumento da absorvância do azul de xilidil a 505/694 nm é proporcional à concentração de magnésio na amostra. O cálcio é excluído da reação por complexação com EGTA.

#### 3.1.8.4. Ferro

**Nota:** O ferro é encontrado na hemoglobina dos glóbulos vermelhos (70%) e na forma de ferritina e hemossiderina (30%) onde está armazenado. A homeostasia do ferro é muito particular, estando regulada principalmente pela absorção a nível intestinal, uma vez que apenas 10% do ferro ingerido é absorvido. Após a sua absorção é transportado até ao plasma, onde se liga á transferrina que o transporta até á medula óssea, onde será incorporado na hemoglobina. As determinações são utilizadas no diagnóstico e no tratamento de anemias de deficiência de ferro, hemocromatose e intoxicação por este mineral (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Ferro\_2 (IRON\_2) é um método colorimétrico que utiliza a ferrozina para a medição direta do ferro, sem um passo de precipitação de proteína e livre de qualquer interferência do cobre endógeno. Este método também contém concentrações elevadas de hidrócloro de guanidina e detergente para evitar a precipitação de proteína com amostras de paraproteinemia e plasma. O ferro férrico é dissociado da sua proteína de transporte, a transferrina, num meio ácido, sendo simultaneamente reduzido a uma forma ferrosa. O ferro ferroso é, em seguida, complexado com ferrozina, um indicador sensível ao ferro, produzindo um cromóforo colorido que apresenta absorção a 571/658 nm.

## 3.2. Sangue Total

### 3.2.1. Hemoglobina glicada HbA1c

**Nota:** A hemoglobina A1, fração da hemoglobina A, é constituída pelas hemoglobinas A1a, A1b e A1c, designadas em conjunto por hemoglobinas glicadas. A hemoglobina A1c é a mais abundante e a que se combina mais fortemente com a glicose. Como 70% da HbA1c é glicada, este teste constitui uma medida muito precisa, visto que representa a maior parte da hemoglobina glicada. A glicação da hemoglobina é um processo irreversível, não enzimático, estando os níveis destas hemoglobinas condicionadas quer pela vida média dos eritrócitos quer pelo valor da glicemia. Assim, o doseamento da A1c traduz os valores da glicémia ao longo das seis a oito semanas anteriores. Esta determinação é útil na monitorização do tratamento dos diabéticos e fornece índice muito preciso do nível médio de glicémia do paciente a longo prazo (2).

**Amostra:** Sangue total colhido com EDTA

**Equipamento:** HA-8160

**Método:** *High-performance Liquid Chromatography* (HPLC). A coluna de separação que esta técnica cromatográfica possui é preenchida com partículas sólidas e a amostra (ex. sangue) é separada em compostos (ex. HbA1c) pela interação com essas mesmas partículas. A separação dos componentes da amostra é influenciada pela condição do solvente líquido, interações químicas entre a amostra e o solvente líquido e interações químicas entre a amostra e as partículas sólidas que se encontram no interior da coluna de separação.

## 3.3. Urina

### 3.3.1. Análise Sumária à Urina (Urina Tipo II)

**Nota:** O exame à urina é um procedimento essencial na avaliação da função renal podendo ainda alertar para outras situações patológicas, sendo um dos indicadores mais úteis do estado saúde ou doença do paciente. Para o efeito são usadas tiras reativas multiparamétricas avaliando qualitativa ou semi-quantitativamente os seguintes parâmetros: Coloração, Densidade específica, pH, Proteínas, Glicose,

Corpos cetônicos, Pigmentos biliares, Bilirrubina, Urobilinogénio, Nitritos, Sangue e Esterase Leucocitária (2).

**Amostra:** Urina recolhida em frasco esterilizado, preferencialmente a primeira da manhã em jejum (rejeitar sempre o primeiro jato)

**Equipamento:** Aution Max AX-4280

**Método:** Reação em tiras teste

Em complemento dos resultados obtidos pela análise de Urina Tipo II, procede-se à análise do sedimento urinário: Consiste no exame microscópico de sedimento da urina obtido após centrifugação. Avaliam-se qualitativa e semi-quantitativamente os elementos celulares presentes (células epiteliais do trato urinário superior e inferior, os glóbulos brancos e vermelhos), cilindros, cristais, bactérias, parasitas e fungos (leveduras).

#### 3.3.1.1. Contagem ou Prova de Addis

**Nota:** A contagem ou prova de Addis é uma medida quantitativa da excreção de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais e cilindros na urina colhida por um período de 3, 12 ou 24 horas efetuada em câmara própria, a partir de uma alíquota concentrada do volume total de urina. A excreção de proteínas e a densidade da amostra também são determinadas. Este teste permite a monitorização doença renal ativa, como a glomerulonefrite aguda (6).

**Amostra:** Urina das 3, 12 ou 24 horas.

**Método:** O sedimento urinário, retirado do tubo contendo urina após centrifugação é colocado numa câmara de Newbauer modificada (Fig 7). Posteriormente, é analisado ao microscópio para avaliar quantitativamente os elementos na urina.



Figura 7 - Câmara de Newbauer modificada

### 3.3.2. Pesquisa de drogas de abuso

**Nota:** O estudo toxicológico da urina é utilizado na avaliação de abuso, *overdose* ou envenenamento por substâncias ilícitas (2). No laboratório, o estagiário efetuou pesquisa das principais drogas de abuso na urina: opiáceos, canabinóides (THC), cocaína e anfetaminas.

**Amostra:** Urina ocasional

**Método:** A metodologia usada para detetar drogas na urina baseia-se na imunocromatografia. Uma enzima ligada à droga é colocada em contacto com o anticorpo monoclonal contra a droga, o que impede a atividade da enzima quando em contacto com o substrato. Em presença de uma amostra com droga (livre), esta vai competir com a droga ligada à enzima para o anticorpo, ficando algumas moléculas do complexo enzima-droga livres, ocorrendo reação enzimática quando em contato com o substrato.

### 3.3.3. Pesquisa da proteína de Bence Jones

**Nota:** A proteína de Bence Jones consiste em cadeias leves livres (não se encontram acopladas a anticorpos) podendo estar presentes na urina ou soro. Devido à sua pequena dimensão e elevada solubilidade são encontradas na urina em maiores concentrações. Esta pesquisa é útil no diagnóstico de patologias como o mieloma múltiplo, macroglobulinemia, linfomas, leucemia entre outras (1).

**Amostra:** Urina

**Método:** Utilização do método de aquecimento com base no grau de solubilidade da proteína a diferentes temperaturas (coagulação entre 40°C - 60°C e solubilização a 100°C).

### 3.3.4. Determinações Quantitativas

**Nota:** Da mesma forma que se analisa o soro e plasma, é possível determinar na urina, de forma quantitativa, certos parâmetros bioquímicos com valor semiológico.

**Amostra:** Urina aleatória ou das 24 horas

**Métodos:** São utilizados os mesmos métodos e equipamentos referenciados para as respectivas determinações sanguíneas.

- Glicose

A glicosúria, geralmente ocorre quando o nível sanguíneo de glicose é superior a 180-200 mg/dL. A utilidade desta determinação continua a ser o rastreio e confirmação do diagnóstico de diabetes (principal patologia responsável por glicosúria) bem como a monitorização do seu grau de controlo (1).

- Ácido Úrico

A excreção excessiva de ácido úrico na urina está relacionada com ingestão excessiva de purinas (fígado, feijão, alguns peixes, carne) que sofrem oxidação. Os uratos são completamente filtráveis nos túbulos renais mas, podem ocorrer formação de massas ou cálculos de ácido úrico causando obstruções (4).

- Cálcio

Cerca de 10g de cálcio são filtradas diariamente pelos rins e praticamente todo ele é reabsorvido pelas células tubulares renais. A perda de cálcio na urina ocorre através do trato gastrointestinal e também do suor (4). O cálcio urinário aumentado pode resultar de vários processos metabólicos, entre os quais o aumento de absorção intestinal de cálcio e da reabsorção óssea e ausência de reabsorção tubular adequada de cálcio. Os níveis reduzidos de cálcio na urina são observados em sintomas de tetania (1).

- Amilase

A atividade enzimática urinária da amílase é utilizada para ajudar a estabelecer o diagnóstico de pancreatite, embora algumas doenças não pancreáticas possam produzir aumento da concentração urinária de amílase. Na pancreatite, o aumento da excreção urinária da enzima é mais precoce, frequente e prolongado que o nível sérico (2).

- Ureia

Sendo a ureia um metabolito das proteínas exógenas, dietas ricas em proteínas podem provocar aumentos significativos de ureia no plasma e consequentemente dos níveis urinários. A *clearance* da ureia é um fraco indicador da Taxa de Filtração

Glomerular devido à sua produção depender de fatores não renais, como a dieta e atividade das enzimas do ciclo da ureia.

- Creatinina

A determinação da creatinina é usada para avaliar a *clearance*, estimando a Taxa de Filtração Glomerular. É usual também efetuar-se o doseamento da creatinina conjuntamente com outros analitos para os relacionar com a excreção urinária.

- Fósforo

A maior parte do fósforo absorvido a partir dos intestinos é excretada na urina, sendo parte reabsorvido a nível tubular na forma de fosfato inorgânico, processo este que é inibido pela hormona da paratiroide (PTH), podendo conduzir a alterações da concentração deste ião no sangue e na urina (4).

- Magnésio

A filtração do magnésio no glomérulo e a sua reabsorção nos túbulos proximais são comparáveis com as de cálcio e ocorre através da PTH. A excessiva perda renal é uma importante causa da deficiência de magnésio. Já o aumento moderado da concentração de magnésio no plasma ocorre em pacientes com falha renal crónica num estado avançado (4).

- Sódio

O sódio é responsável por manter o equilíbrio ácido – básico no organismo. É filtrado nos glomérulos e reabsorvido no túbulos renais. A quantificação deste analito permite o diagnóstico de desequilíbrios renais, supra-renais e ácido-básicos (1).

- Cloreto

A determinação de cloro na urina fornece uma indicação do estado do equilíbrio eletrolítico do paciente, é também usada para diagnosticar desidratação e monitorizar efeitos de dietas com diminuição do teor em sal (1).

- Potássio

Os rins excretam 80 a 90% do potássio ingerido. A colheita de 24h é particularmente importante na avaliação quer do equilíbrio eletrolítico quer do equilíbrio ácido - base, também possui relevância em doenças renais e supra renais (2).

- Microalbuminúria

A microalbuminúria resulta num aumento da albumina (proteína plasmática responsável pela força osmótica do sangue) urinária abaixo do limite detetável. A microalbuminúria ocorre muito antes da proteinúria clínica se tornar evidente. Este teste é utilizado para o rastreio, monitorização e deteção da deterioração da função renal principalmente em pacientes diabéticos (1).

**Amostra:** Primeira urina da manhã ou de 24 horas

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Microalbumina ( $\mu$ ALB) é um método imunoturbidimétrico intensificado por PEG. Uma amostra com albumina de origem humana é diluída de forma adequada e feita reagir com anti-soro específico para formar um precipitado que pode ser medido por turbidimetria a 340 nm. A concentração de albumina na amostra é determinada pelo cálculo de uma curva padrão a partir das normas de absorvância.

### 3.3.5. Proteínas Totais na Urina (UPRO)

**Nota:** A filtração e reabsorção das proteínas do plasma na formação da urina são funções importantes de um sistema renal saudável, portanto a urina não deve conter proteínas, ou contém apenas traços. A presença de elevadas concentrações de proteína na urina (proteinúria) pode ser um indicador importante de doença renal. A presença de proteínas na urina é encontrada em pacientes com distúrbios sistémicos que afetam os rins, tais como diabetes mellitus, hipertensão, doenças vasculares, neoplasia, intoxicação por drogas e determinadas doenças infecciosas (1).

**Amostra:** Urina de 24 horas

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Proteína Total\_2 (UPRO\_2) é um método cujo procedimento tem por base a ligação de corantes. Este método é uma reação química de ponto final. Baseia-se na determinação do desvio de absorção que ocorre quando o complexo de vermelho pirogalhol e de molibdato se liga a grupos de proteínas com aminoácido básico e protões num pH ácido. O aumento de absorvância a 596/694 nm é proporcional à concentração de proteínas na amostra.



### 3.4. Fezes

#### 3.4.1. Pesquisa de Sangue Oculto

**Nota:** Qualquer sangramento a nível intestinal é sempre alarmante e nunca deve ser descurado. A presença de sangue nas fezes é vulgarmente observado quando existe hemorroidas e fissuras anais, no entanto, a presença de sangue oculto pode ser útil para compreender ou localizar um distúrbio do trato gastrointestinal. A presença de úlcera gástrica, carcinoma do cólon e carcinoma gástrico, algumas parasitoses e fármacos anti-inflamatórios não esteróides, estão associados a uma perda sanguínea intestinal aumentada (1).

**Amostra:** Fezes

**Método:** O teste bioNexia FOBplus baseia-se no método imunocromatográfico, no qual apenas é reconhecida hemoglobina humana através de reações de anticorpos específicos. A hemoglobina presente na amostra de fezes reage com um anticorpo monoclonal específico marcado com ouro. Este complexo ouro-anticorpo-hemoglobina migra por ação capilar pela membrana e atinge a região da linha de teste (T) que se encontra pré-revestida com anticorpos anti-hemoglobina. O complexo ouro-anticorpo-hemoglobina é capturado pelos anticorpos imobilizados na membrana, resultando na formação de linhas vermelhas. A presença de uma linha vermelha na região de teste (T) indica um resultado positivo. Se a amostra de fezes não contiver hemoglobina, não surgirá nenhuma linha na região da linha de resultado de teste (T) indicando um resultado negativo.

### 3.5. Líquido Seminal

#### 3.5.1. Espermograma

A análise do líquido seminal é uma primeira abordagem ao estudo de infertilidade masculina. A sua produção depende da função dos testículos. Após 2 a 3 dias de abstinência sexual este líquido é colhido e examinado.

**Método:** Efetuou a análise completa do líquido seminal:

- Exame macroscópico
  - Aparência
  - Liquefação

- Viscosidade
- Exame Físico-Químico
  - Volume total
  - Reação ao pH
- Exame microscópico
  - Exame citológico
- Mobilidade
  - Progressiva rápida
  - Progressiva lenta
  - Não progressiva
  - Imóveis
- Concentração
  - N° de espermatozoides: milhões/mL
- Morfologia
  - Forma normais
  - Formas anormais
    - ✓ Com alterações na cabeça
    - ✓ Com alterações no pescoço/peça intermédia
    - ✓ Com alterações na cauda
    - ✓ Com inclusão citoplasmática na peça intermédia

## **Hematologia**

O estudo do sangue e dos seus constituintes é o ponto fundamental desta ciência – a Hematologia. O sangue é o líquido corporal mais utilizado para fins analíticos e os exames efetuados são utilizados para avaliar inúmeros processos e distúrbios (2). É, portanto, uma valência de extrema importância num laboratório, onde o conhecimento e a experiência são fundamentais para uma boa prática. O microscópio ótico, ainda nos dias de hoje, é uma ferramenta indispensável no auxílio de determinados diagnósticos.

Nesta valência do laboratório, o estagiário passou pelas fases pré-analítica (acompanhamento e manutenção das técnicas hematológicas, colheita, tratamento e preparação para análise das amostras biológicas), analítica (execução e validação analítica das análises hematológicas efetuadas no laboratório, bem como realização e avaliação do controlo interno de qualidade) e pós-analítica (acompanhou, com a sua orientadora, a validação biopatológica, colaborando no estudo de situações analíticas, no contacto com os clínicos para o esclarecimento de situações relacionadas com os utentes).

### **4. Controlo de Qualidade em Hematologia**

Como referido anteriormente, o laboratório Hemobiolab encontra-se certificado e possui um programa de Controlo de Qualidade Interno, participa também no Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Hematologia do INSA Dr. Ricardo Jorge.

O Programa de Avaliação Externa da Qualidade permite ao laboratório, de uma forma periódica, a avaliação do seu desempenho, em termos de exatidão, para os parâmetros do Hemograma e Provas de Coagulação, realizados nos respetivos equipamentos (através da análise de amostras específicas), e avaliação da morfologia do Sangue Periférico (através da observação microscópica de esfregaços sanguíneos enviados para o efeito).

O Programa de Controlo de Qualidade Interno é uma ferramenta indispensável na monitorização da qualidade analítica dos resultados de um laboratório, permitindo, entre outras coisas, avaliar o grau de precisão das diferentes técnicas montadas. O grau de confiança nos resultados está dependente de um controlo de qualidade interno implementado corretamente. O laboratório Hemobiolab utiliza, na área da Hematologia, controlos fornecidos pelas casas comerciais dos aparelhos. Os dados

são registados e analisados diariamente com base nas cartas de controlo apresentadas pelo *software* dos equipamentos. Para aceitação do Controlo Interno, seguem-se as regras de Levey – Jennings descritas no ponto 1 do relatório.

## 5. Equipamentos

Nesta valência o laboratório possui:

- **Horiba ABX Pentra 120 DX** (Fig.8)



**Figura 8 - Horiba ABX Pentra 120 DX**

Este equipamento permite, de forma automática, a realização do eritrograma, leucograma, plaquetograma e contagem de reticulócitos, fornecendo dados muito completos sobre o estudo das células do sangue. Resumidamente, neste aparelho:

A contagem de partículas (leucócitos, eritrócitos e plaquetas) é efetuada por impedânciometria: o sangue, diluído numa solução condutora isotónica, atravessa uma abertura onde passa corrente elétrica, localizada nas câmaras de contagem. A passagem das células (não condutoras), provoca um aumento da resistência elétrica (impedância) entre dois eléctrodos, submersos e localizados de cada lado da abertura. Cada impulso elétrico e sua amplitude correspondem, respetivamente, a uma célula e ao seu volume.

O doseamento da hemoglobina (Hb) é feito por espectrofotometria. Tem como base o método da cianometahemoglobina, mas é realizado após lise dos eritrócitos com um reagente sem cianeto.

A medição do volume globular médio (VGM) é efetuada por impedânciometria.

A contagem diferencial de leucócitos é efetuada pela combinação de variações de impedância (contagem e determinação do volume das células) com condutividade celular e dispersão (*scatter*) da luz laser (diferenciação do conteúdo, avaliação das características da superfície e morfologia celular): a amostra é diluída com um reagente leucoprotetor e que, ao mesmo tempo, promove a lise dos eritrócitos. Os leucócitos passam para uma câmara onde são contados por impedânciometria. Ao incidir um feixe de laser sobre as células, este é desviado em diferentes sentidos e detetado por sensores. Este desvio está associado à presença de grânulos, lóbulos nucleares e superfície celular, permitindo caracterizar a complexidade celular e distinguir as diferentes populações.

O **Eritrograma** define-se por três parâmetros quantitativos:

- Contagem de eritrócitos (RBC) - n.º de eritrócitos por unidade de volume de sangue total, expressa em  $10^{12}/L$ .
- Hematócrito (Ht) – proporção do volume da amostra de sangue que é ocupado pelos eritrócitos. Expressa-se em percentagem ou em litros por litro (L/L) e pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$Ht = \text{Volume Globular Médio (VGM)} \times N^{\circ} \text{ erit.} / 100$$

- Concentração da Hemoglobina (Hb) – a hemoglobina é uma proteína dotada de uma coloração forte, o que permite a sua quantificação por métodos colorimétricos e espectrofotométricos. As várias formas de hemoglobina patentes no sangue incluem a oxihemoglobina, a carboxihemoglobina e a metemoglobina, entre outras. Podem ser convertidas num único componente estável comum, a cianometemoglobina. O doseamento desta permite a determinação da concentração de hemoglobina. Expressa-se em gramas por decilitro (g/dL) do sangue total.

Três índices hematimétricos permitem descrever características qualitativas médias:

- Volume Globular Médio (VGM) – o volume médio dos eritrócitos é um índice útil na classificação das anemias. A anemia classifica-se como normocítica quando os valores do VGM se encontram dentro da normalidade, macrocítica quando o VGM está elevado ou microcítica quando o VGM se encontra reduzido.

Expressa-se em fentolitros (fl ou  $\times 10^{-15}$ ). Neste aparelho é determinado por impedânciometria, mas pode ser calculado pela fórmula:

$$\text{VGM} = \text{Ht} / \text{N}^{\circ}\text{erit.}$$

- Hemoglobina Globular Média (HGM) – medida do conteúdo de hemoglobina por eritrócito. Expressa-se em picogramas (pg ou  $\times 10^{-12}$ ) e pode ser calculada pela fórmula:

$$\text{HGM} = \text{Hg} / \text{N}^{\circ}\text{erit.}$$

- Concentração Média de Hemoglobina Globular (CMHG) – Concentração média de hemoglobina por eritrócito. É a base da classificação da cromia: normocromia diz respeito a CMHG dentro dos valores de referência; hipocromia traduz diminuição da coloração normal dos eritrócitos. Note-se que, salvo raras exceções (p.e. esferocitose), não há hiperchromia visto o CMHG nunca poder ultrapassar 36% ou 36 g/dl, que é o seu limite superior. A CMHG expressa-se em g/dl ou percentagem e pode ser calculada utilizando a fórmula apresentada:

$$\text{CHGM} = \text{Hg} / \text{Ht}$$

Com base no VGM, o aparelho pode calcular:

- Amplitude de distribuição eritrocitária (RDW) – indica a variação da distribuição dos volumes eritrocitários individuais, correlacionando-se com a anisocitose.

O **Leucograma** permite:

- Contagem diferencial dos leucócitos – quantificação e separação dos leucócitos em 5 subpopulações (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos). Geralmente chamada de “fórmula leucocitária”, expressa-se em percentagem e valor absoluto ( $\text{N}^{\circ}$  leucócitos.  $\times 10^9/\text{L}$ ).

O **Plaquetograma** disponibiliza os seguintes dados:

- Número total de plaqueta (PLT) – expressa-se em  $\text{N}^{\circ}$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ .

- Plaquetócrito (PCT)
- Volume médio das plaquetas em relação ao sangue total (VPM)
- Amplitude de distribuição plaquetária (PDW)

Assim como no eritrograma, os índices, plaquetócrito (PCT), VPM e PDW são representados da mesma forma que o hematócrito (Ht), VCM e RDW, respetivamente.

O Horiba ABX Pentra 120 Dx inclui um *software* que gera um relatório com a apresentação e interpretação dos resultados obtidos:

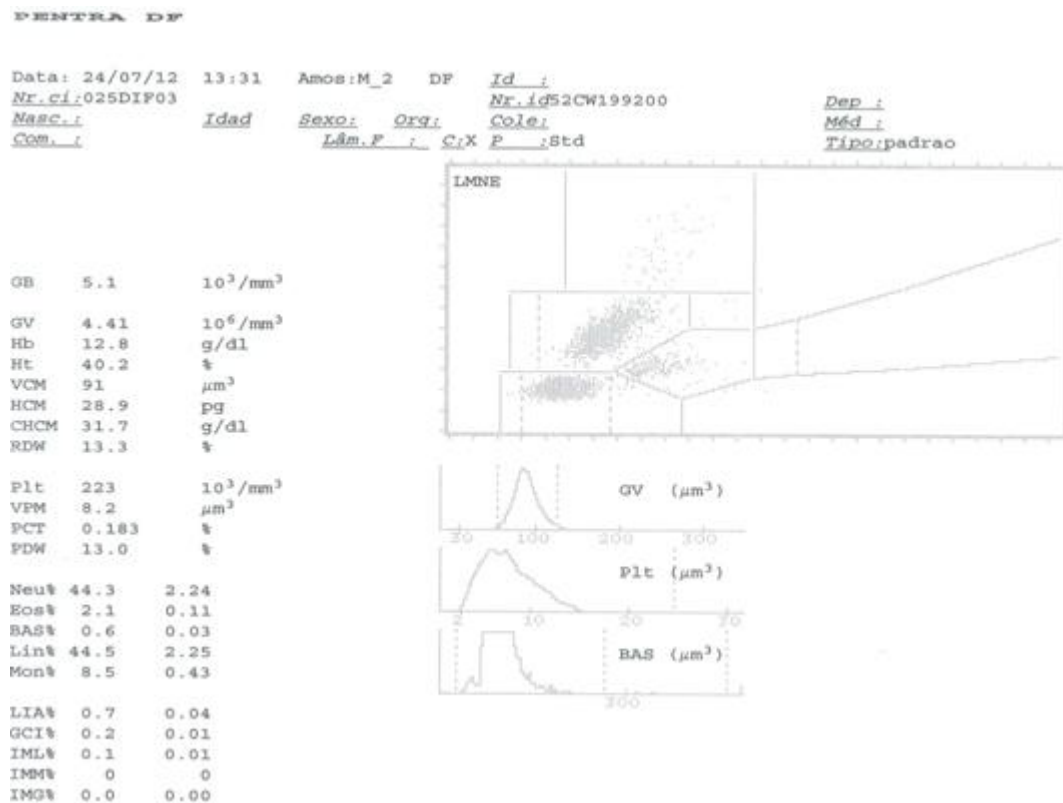


Figura 9 – Relatório obtido através do equipamento Horiba ABX Pentra 120 DX

- VesMatic Cube 80 (Fig. 10)



Figura 10 - VesMatic Cube 80

Este aparelho permite medir o grau de sedimentação dos glóbulos vermelhos. A determinação normal da VS é executada, de forma automática, em 26 minutos, diretamente nos tubos de EDTA.

O método baseia-se em 4 passos:

- 1 - Homogeneização da amostra;
- 2 - Primeira leitura (feixe de luz);
- 3 - Sedimentação eritrocitária (20 minutos);
- 4 - Segunda leitura (feixe de luz).

Basicamente, é medida a distância entre o nível superior do plasma e o início da camada de glóbulos vermelhos sedimentados. Os resultados obtidos são correlacionados com o método de referência de Westergren (mm/h): - sangue anticoagulado com citrato é aspirado para a pipeta de Westergren até à marca "0". A VS é lida, em mm, ao fim de 60 minutos.

- **Siemens BCS®** (Fig. 11)



**Figura 11 - Siemens BCS®**

O aparelho Siemens BCS® realiza provas coagulométricas e cromogénicas, com aspiração de plasma citratado diretamente do tubo primário. O método baseia-se na deteção foto-ótica do coágulo, através das mudanças na intensidade da luz dispersa, devido ao aumento da turvação quando o fibrinogénio se transforma em fibrina. A luz emitida pelo díodo emissor é refletida e dispersa pela amostra. O foto-díodo recetor absorve a luz dispersa e converte a intensidade detetada em sinais elétricos. Um



microprocessador monitoriza estes sinais e utiliza-os para determinar o tempo de coagulação da amostra.

## **6. Citologia das Células Sanguíneas**

### **6.1 Hemograma**

O hemograma é uma das análises mais frequentemente requisitadas ao laboratório clínico e é o exame de primeira linha no estudo da função hematológica. Permite a quantificação e análise morfológica dos elementos figurados do sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. O sangue é colhido por punção venosa para tubos contendo um anticoagulante. Os três anticoagulantes mais utilizados são o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), a heparina e o citrato trissódico. O EDTA remove o cálcio necessário à coagulação e é o anticoagulante mais indicado para contagens de células sanguíneas porque induz uma anticoagulação completa com menos impacto sobre as células. A heparina atua pela formação de um complexo com a antitrombina, prevenindo a formação de trombina. É utilizada nos testes de fragilidade osmótica para prevenir a hemólise dos eritrócitos e nos testes funcionais e imunológicos dos leucócitos. O citrato trissódico atua pela remoção de cálcio e é o anticoagulante mais utilizado nos estudos da coagulação e das plaquetas.

No Hemobiolab, a maioria das amostras são colhidas diretamente para tubos comerciais de vácuo (Vacuet®) com pressões negativas que contêm a concentração correta de anticoagulante, minimizando as possíveis fontes de erro. Após a colheita, o sangue anticoagulado pode ser armazenado a 4°C durante 24 horas mas, idealmente, deverá ser analisado o mais rapidamente possível.

### **6.2. Estudo Morfológico do Sangue Periférico**

No exame morfológico, recorre-se à observação microscópica de um esfregaço sanguíneo corado para avaliação das características e/ou alterações dos elementos figurados do sangue.

Nesta valência, executou esfregaços sanguíneos e procedeu à sua coloração com corantes do tipo Romanovsky (coloração de Wright). Observou microscopicamente os esfregaços, de forma a efetuar o estudo morfológico das diferentes séries sanguíneas. A observação microscópica começa por executar-se com a objetiva de 40x, para se avaliar a qualidade do esfregaço e proceder à escolha do campo, passando depois

para a objetiva de imersão (100x), com a qual se vai efetuar a contagem celular e seu estudo morfológico.

### **Série Vermelha**

O tamanho de um eritrócito normal ronda um diâmetro de 7,2 micras e um volume de 80 a 96 fentolitros. A coloração acidófila do eritrócito é dada pela hemoglobina e reflete, de forma indireta, a sua quantidade. A forma normal de um eritrócito representa caracteristicamente um disco bicôncavo. A visualização de um esfregaço permite observar outras formas que poderão estar relacionadas fisiológica ou patologicamente com diversas situações.

### **Série Branca**

A observação microscópica, para além da contagem diferencial expressa em percentagem, permite observar alterações morfológicas, formas atípicas e percursores leucocitários, que em casos normais não se encontram presentes no sangue periférico.

### **Plaquetas**

As plaquetas são células redondas e anucleadas formadas na medula óssea a partir de megacariócitos e cuja principal função é manter a integridade vascular. A sua quantidade, morfologia e tamanho devem ser avaliados com muito cuidado, uma vez que podem sofrer alterações em reação aos anticoagulantes usados, principalmente o EDTA. Na presença de agregados plaquetares formados *in vitro* pela ação dos anticoagulantes, os aparelhos automáticos podem reportar falsas contagens de plaquetas. A observação microscópica torna-se, assim, fundamental para diferenciar verdadeiras trombocitopenias de “pseudotrombocitopenias” (2).

### **Interpretação do Resultado**

A observação do esfregaço sanguíneo, em complemento com os dados do hemograma, ajuda no diagnóstico e seguimento de diversas patologias hematológicas e é útil na investigação de diversos processos inflamatórios e infecciosos.

### 6.3. Reticulócitos

**Princípio:** Os reticulócitos são eritrócitos jovens, anucleados, que contêm restos de RNA e ribossomas. A sua contagem em sangue periférico é útil na avaliação da atividade eritropoética e na função da medula óssea. Utilizam-se corantes supravitalis, como o azul-de-metileno novo ou o azul brilhante de cresil, de modo a poderem ser identificados microscopicamente (2).

**Método:** A contagem de reticulócitos, no laboratório, é determinada com base em métodos automáticos. A técnica automática é realizada no equipamento Pentra 120 DX. Esta contagem tem por base a coloração dos reticulócitos com o corante Tiazole Orange. Para cada reticulócito é determinado o volume (por impedânciometria) e o conteúdo de RNA (por difração e citometria de fluxo). Assim, é possível fazer a diferenciação entre reticulócitos de alto, médio e baixo conteúdo de RNA.

**Interpretação dos Resultados:** O resultado é dado em percentagem de reticulócitos em relação ao número de eritrócitos, e dá uma estimativa da velocidade de produção de glóbulos vermelhos pela medula óssea.

## 7. Citoquímica das células sanguíneas

A importância da citoquímica é cada vez mais relativa, uma vez que as tecnologias de imunofenotipagem proporcionam, nos dias de hoje, uma forma mais sensível, rápida e completa de obter dados relativos às células analisadas. No entanto, estas técnicas ainda não estão disponíveis na grande maioria dos laboratórios de análises clínicas nacionais, devido ao elevado custo inerente ao processo e à necessidade de técnicos especializados. Por isso, em laboratórios de rotina, algumas técnicas de citoquímica continuam a ter um papel preponderante na área da hematologia.

### 7.1 Mieloperoxidase / Sudão Negro B

A coloração por Sudão Negro B ajuda na diferenciação das células imaturas de leucemias agudas corando várias gorduras e lípidos. A mieloperoxidase é um marcador para células da linhagem mielocítica, a linhagem linfocítica não apresenta qualquer atividade desta enzima, portanto esta coloração é útil para observar leucemias mielóides mas não linfóides. A série monocitóide pode, no entanto, apresentar alguma positividade para esta enzima (1).

**Método:** Observou esfregaços sanguíneos corados pelo Sudão Negro, reagente que atua nos lípidos intracelulares, corando os grânulos primários e secundários da linha mielóide. Na prática clínica equivale à reação das mieloperoxidases.

**Interpretação do Resultado:** A atividade da enzima é revelada pela visualização de produtos da reação castanho-preto. Estas colorações auxiliam no diagnóstico de determinadas leucemias mieloblásticas.

## **8. Físico-química das Células Sanguíneas**

### **8.1 Velocidade de Sedimentação (VS)**

As células sanguíneas em suspensão no plasma, em presença de um anticoagulante, tendem a sedimentar pela força da gravidade. Os eritrócitos possuem na sua superfície um excesso de cargas negativas que promovem uma natural repulsão entre si. A sedimentação eritrocitária de sangue anticoagulado depende da capacidade do plasma diminuir a carga eletrostática da superfície do eritrócito facilitando a sua agregação. A velocidade de sedimentação globular é um teste sensível, porém inespecífico, usado para a detecção e evolução de um processo inflamatório, infecções agudas e crônicas e neoplasias avançadas (2).

**Método:** O Hemobiolab possui um equipamento VesMatic Cube 80 (Fig. 10) para medição do grau de sedimentação dos glóbulos vermelhos e cuja descrição do método se encontra no ponto 5 do relatório.

**Interpretação do Resultado:** A elevação da VS em relação aos valores normais pode resultar de condições fisiológicas (idade, sexo feminino, período menstrual e gravidez) ou de condições patológicas (infecções e inflamações ativas, anemias, leucemias, etc). A diminuição da VS pode ser causada por alterações da série vermelha (eritrocitose, poiquilocitose) e pela diminuição de algumas proteínas plasmáticas como o fibrinogénio, alfa, beta e gama globulinas que, sendo carregadas positivamente, neutralizam as cargas negativas dos eritrócitos, facilitando a sua sedimentação.

### **8.2. Pesquisa de Células Falciformes**

**Princípio:** O rastreamento da hemoglobina S é um teste solicitado sempre que há suspeitas de anemia falciforme ou drepanocitose. Nesta patologia observa-se uma

alteração das cadeias de hemoglobina com substituição do ácido glutâmico pela valina. Quando a hemoglobina S (que tem uma solubilidade muito diminuída) sofre desoxigenação, ocorre polimerização e formação de cristais fluidos. Como consequência, alguns eritrócitos perdem a sua morfologia normal e aparecem alongados e encurvados, em forma de foice (células falciformes) (2).

**Método:** Observou ao microscópio a presença de células falciformes numa amostra de sangue em lâmina. A lâmina é preparada com a mistura de uma gota de metabissulfito (2%) e uma gota de sangue fresco, coberta com uma lamela e selada com parafina, seguida de 15 minutos em estufa a 37°C.

**Interpretação do Resultado:** A velocidade de falciformação é diretamente proporcional à quantidade de hemoglobina S nos eritrócitos. Por isso, ao fim de 15 minutos de desoxigenação, podemos avaliar a presença e quantidade de células falciformes na amostra. No entanto, este teste não permite distinguir a anemia de traço falciforme (homozigótica) de outras síndromes (heterozigóticas).

## 9. Estudos de Hemostase

O Sistema Hemostático protege o sistema vascular e permite que, em caso de lesão, os tecidos sejam reparados e as suas funções restabelecidas. Depende de complexas interações entre a parede dos vasos, as plaquetas e os processos de coagulação e fibrinólise. É um dos mecanismos de defesa mais básicos do organismo pois preserva a integridade da circulação e limita a perda de sangue.

A sequência de reações locais que culmina no controlo da hemorragia, a partir de um vaso lesado, define-se como Hemostase. É regulada por diferentes mecanismos e inclui várias fases:

- Resposta vascular (constricção do vaso lesado);
- Hemostase primária (formação do trombo plaquetário);
- Hemostase secundária ou coagulação (formação do coágulo de fibrina);
- Hemostase terciária ou fibrinólise (lise do coágulo de fibrina e reparação dos vasos para o restabelecimento do fluxo sanguíneo normal)

O Hemobiolab está equipado com um analisador automático de coagulação Siemens BCS® (Fig. 11), que realiza provas coagulométricas e cromogénicas, com aspiração de plasma citratado diretamente do tubo primário.

### 9.1. Tempo de Protrombina (TP)

**Princípio:** O tempo de protrombina consiste na medição do tempo, em segundos, que uma amostra de plasma demora a coagular. Este plasma deve ser anticoagulado com citrato de sódio e desprovido de plaquetas. Para desencadear a formação do coágulo adiciona-se tromboplastina. O TP mede a atividade de diversos fatores de coagulação, como o I (fibrinogênio), II (protrombina), V, VII, e X, sendo a prova de eleição para a investigação do sistema extrínseco da coagulação. Desta forma, está indicado na monitorização da anticoagulação com cumarínicos, rastreamento de distúrbios do sistema da coagulação e avaliação da função hepática (1). Desta forma, tornou-se necessário padronizar o valor do TP através do cálculo do INR (*International Normalized Ratio*). Esta razão normalizada tem em conta a sensibilidade do reagente (medida mediante o ISI – *International Sensibility Index*) e a relação entre o tempo que a amostra e um plasma padrão levam a coagular:

$$INR = (TP \text{ amostra} / TP \text{ padrão}) \times ISI$$

**Método:** Os valores de tempo de protrombina obtidos são convertidos pelo equipamento em percentagem (Taxa de Protrombina) e INR.

**Interpretação do Resultado:** O TP encontra-se fora dos valores de referência em doentes hipocoagulados com doses incorretas de anticoagulantes orais. Para além disso, pode encontrar-se encurtado por ação de certos medicamentos (barbitúricos, diuréticos, digitálicos, vitamina K, anticoncepcionais orais) e pode encontrar-se prolongado em situações como deficiências congénitas dos certos fatores da coagulação (I, II, V, VII e X), quando a concentração do fibrinogênio é inferior a 100 mg/dl e na deficiência de vitamina K. Atualmente, é mais usual e correto utilizar o INR.

### 9.2. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (aPTT)

**Princípio:** O tempo de tromboplastina parcial ativado consiste na medição do tempo, em segundos, que uma amostra de plasma demora a coagular. Este plasma deve ser anticoagulado com citrato de sódio e desprovido de plaquetas. Para desencadear a formação do coágulo adiciona-se cefalina cálcica (que atua como substituto do fator III plaquetar) e caulino (que ativa os fatores de contacto) (1).

**Método:** O estagiário executou a técnica no Siemens BCS, com mesmo método de detecção do coágulo usado para determinar o tempo de protombina.

**Interpretação do Resultado:** O aPTT permite quantificar a presença dos fatores VIII, IX, XI e XII, sendo, desta forma, um bom método de rastreio e diagnóstico de anomalias nas vias intrínseca e comum da coagulação sanguínea. Ao contrário do TP, o aPTT está indicado para a monitorização da terapêutica com heparina.

### 9.3. Fibrinogénio

**Princípio:** O fibrinogénio (fator I da coagulação) é uma glicoproteína plasmática, produzida no fígado, que, sob influência da trombina, é convertida em fibrina. Desta forma, a sua concentração no plasma está intimamente ligada à formação do coágulo e a uma hemostase adequada sendo utilizada na suspeita de um distúrbio hemorrágico.

**Método:** Executa-se a técnica no BCS, com um método idêntico ao descrito anteriormente para a PT e aPTT. O tempo consumido, em segundos, para a formação do coágulo de fibrina após adição de trombina, é inversamente proporcional ao nível de fibrinogénio. O resultado é dado em concentração, através da correspondência entre o tempo encontrado e a curva de calibração obtida para cada lote de calibrador.

**Interpretação do Resultado:** Para além de ter um papel importante na hemostase, o fibrinogénio é uma proteína de fase aguda, podendo estar aumentado na resposta inflamatória, mas também devido ao tabagismo, no uso de contraceptivos orais e na gravidez. Níveis diminuídos de fibrinogénio podem ocorrer quando há compromisso da função hepática.

## 10. Imunohematologia

O termo Imunohematologia refere-se ao estudo serológico, genético, bioquímico e molecular de antígenos existentes nas membranas das células sanguíneas, bem como às reações e propriedades imunológicas dos componentes e constituintes do sangue.

## 10.1. Grupos Sanguíneos Eritrocitários

À superfície dos eritrócitos, foram identificados mais de 300 tipos de antígenos distintos. Naturalmente, ou por imunização, podem ocorrer no soro dos indivíduos anticorpos para antígenos que não possuem, o que influencia a prática de transfusões e transplantes (1). As diversas categorias de antígenos eritrocitários estão organizadas, pela *International Society of Blood Transfusion* (ISBT), em cerca de 30 sistemas de grupos, em que os principais são o sistema ABO e o sistema Rh (7).

### 10.1.1. Sistema ABO

Descoberto em 1900, o sistema ABO reveste-se da maior importância para a seleção e transfusão de sangue. Este sistema consiste na classificação em dois fatores antagênicos – A e B – e quatro fenótipos fundamentais – A, B, AB e O.

Os antígenos A e B são autossômicos codominantes e expressam-se à superfície dos eritrócitos dos grupos A, B e AB, respectivamente. Em contraste, o grupo O corresponde a um fenótipo autossômico recessivo, refletindo a ausência dum gene ABO funcional. No mesmo sangue não coexiste as isoaglutininas e os isoaglutinogênios, ou seja, o soro contém regularmente as isoaglutininas ativas para os isoaglutinogênios ausentes.

### 10.1.2. Sistema Rhesus

Este sistema caracteriza-se pela existência de um “mosaico” de antígenos na membrana do eritrócito e pela ausência de aglutininas no soro. São seis os antígenos principais: D, C, E, d, c, e. O antígeno D por ser, a seguir aos antígenos A e B, o segundo grupo de antígenos mais imunogénico, é, por esse motivo, mais importante clinicamente na prática da transfusão (1).

**Método:** O estagiário executou a tipagem de rotina dos sistemas ABO e Rh por microtipificação em ID-Card (ScanGel) (Fig. 12), que inclui testes para os antígenos A, B e D.



Figura 12 - Cartão para determinação do Grupo Sanguíneo (ABO e Rh)



**Amostra:** Sangue anticoagulado com EDTA

**Material e reagentes:**

Material:

- *Cards ScanGel Monoclonal A-B-D*
- Centrifugadora (*ScanGel Centrifuge*)

Reagentes:

- Os 1º e 4º microtubos contém gel impregnado de reagente monoclonal de especificidade anti-HBO1 (A)
- Os 2º e 5º microtubos contém gel impregnado de reagente monoclonal de especificidade anti-HBO2 (B)
- Os 3º e 6º microtubos contém gel impregnado de reagente monoclonal de especificidade anti-RH1
- Suspensão de eritrócitos (5%) em *ScanSol*.

**Procedimento:**

a) Preparação extemporânea de uma suspensão de glóbulos vermelhos (5%) em *ScanSol*:

- Distribuir 0,5 mL de *ScanSol* num tubo descartável identificado;
- Adicionar 25 µl de glóbulos da amostra (fundo globular);
- Misturar

b) Técnica:

- Identificar os *Cards ScanGel*;
- Retirar a totalidade da lingueta de alumínio dos *Cards ScanGel*.
- Adicionar 10 µl da suspensão de glóbulos vermelhos (5%) em *ScanSol* a cada poço dos microtubos correspondentes;
- Adicionar imediatamente 25 µl de soro no poço de cada microtubo do card;
- Centrifugar imediatamente durante 10 minutos;\*

- Ler as reações nos microtubos.

Nota: A diferença entre o fim da adição e o início da distribuição não deve exceder 10 minutos.

**Interpretação do Resultado:** A presença de aglutinados à superfície ou dispersos no gel corresponde a um resultado positivo. Os glóbulos vermelhos não aglutinados concentram-se no fundo do microtubo correspondem a um resultado negativo. Sempre que chegou a um resultado Rh negativo, procedeu à pesquisa do factor Du (D fraco), usando soro de Coombs. Sabe-se que alguns glóbulos, inicialmente classificados como Rh negativos, possuíam na realidade uma variante do antígeno D; a presença deste novo antígeno só podia ser demonstrada pelo teste de Coombs. Os glóbulos que possuem esta variante do antígeno D, são chamados glóbulos vermelhos Du. Uma amostra de sangue com esta variante do antígeno D deve ser considerada como “Rh Positivo”.

## **10.2. Teste de Coombs**

O teste de Coombs baseia-se no princípio de que anticorpos antiglobulina humana induzem aglutinação de eritrócitos revestidos por globulinas ou complemento.

Podem realizar-se dois tipos de testes:

- (i) teste direto – deteção de anticorpos ou complemento ligados aos eritrócitos *in vivo*.
- (ii) teste indireto – permite evidenciar a sensibilização de eritrócitos *in vitro*.

O soro de Coombs usado é poliespecífico. Este soro contém anticorpos anti IgG-Humana e anti complemento C<sub>3d</sub> e reage também para IgA e IgM.

### **10.2.1. Teste de Coombs Direto**

O teste de Coombs Direto pesquisa anticorpos fixos “*in vivo*” sobre os eritrócitos, ou seja, é um teste que serve para detetar anticorpos “incompletos” capazes de se unirem ao seu antígeno eritrocitário homólogo sem provocar aglutinação dos eritrócitos.

Os anticorpos incompletos fixos à superfície dos glóbulos vermelhos (ditos sensibilizados) são revelados com um soro de antiglobulina humana (soro de Coombs), provocando a sua aglutinação.

O teste de Coombs direto é usado no diagnóstico da doença hemolítica do recém-nascido, anemia hemolítica autoimune, hemólise induzida por drogas e reações transfusionais hemolíticas (2).

**Método:** Aglutinação em tubo



Figura 13 - Cartões usados para o teste de Coombs indireto

**Amostra:** Sangue total

**Material e reagentes:**

Material:

- Tubos
- Centrifugadora
- Microscópio

Reagentes:

- Solução salina (soro fisiológico)
- Soro de Coombs – Antiglobulina Humana
- Suspensão de glóbulos O Rh +
- Soro anti-D

**Procedimento:**

- Preparar uma suspensão salina (3-5%) dos eritrócitos a serem testados (2 gotas de sangue para 1 mL de suspensão)

- Simultaneamente, preparar uma suspensão salina (3-5%) dos eritrócitos “O Rh Positivo”
- Marcar 3 tubos: controlo positivo, controlo negativo e amostra
- Nos tubos de controlo colocar 1 gota da suspensão salina (3-5%) dos eritrócitos “O Rh Positivo”;
- No tubo da amostra colocar 1 gota dos eritrócitos a serem testados.
- Lavar os eritrócitos adicionando solução salina aos 3 tubos e centrifugar a 1000 rpm, durante 2 minutos. Em seguida, desprezar (com cuidado) o sobrenadante deixando o “botão” de eritrócitos no fundo do tubo;
- Repetir a operação mais duas vezes. Na última operação, com auxílio de papel de filtro, procurar desprezar toda a solução salina;
- Ao tubo de controlo negativo adicionar 2 gotas de solução salina;
- Ao tubo de controlo positivo adicionar 2 gotas reagente anti-D (para tipagem em placa);
- Ao tubo da amostra adicionar duas gotas de soro de Coombs;
- Centrifugar a 1000 rpm durante 1 minutos;
- Ressuspender cuidadosamente as células;
- Observar macroscópica e microscopicamente, procurando aglutinação dos eritrócitos.

#### **Interpretação do Resultado:**

Controlo Positivo – Aglutinação

Controlo Negativo – Sem aglutinação

Soro do doente sem aglutinação – Teste de Coombs negativo

Soro do doente com aglutinação – Teste de Coombs positivo

### 10.2.2. Teste de Coombs Indireto

O teste de Coombs Indireto permite a detecção de anticorpos “incompletos” livres no soro do indivíduo. Por definição, anticorpos incompletos, não aglutinantes, são aqueles que se ligam aos eritrócitos que possuem antígenos específicos, mas não os aglutinam em meio salino. Quando um soro que contém anticorpos incompletos é incubado com eritrócitos que contenham o antígeno correspondente, os anticorpos fixam-se à superfície desses eritrócitos e bloqueiam o antígeno. Esses eritrócitos sensibilizados podem ser revelados pelo soro de Coombs (soro anti-globulina humana). Este teste é utilizado na pesquisa de anticorpos nas grávidas, pesquisa de anticorpos irregulares e em provas de compatibilidade transfusional (2).

**Método:** Microtipificação em *Card (ScanGel)*

**Amostra:** Soro

**Material e reagentes:**

Material:

- Cards ScanGel Coombs Anti-IgG,-C3d
- Centrifugadora (ScanGel Centrifuge)
- Estufa

Reagentes:

- Os microtubos contêm gel impregnado de reagente antiglobulina humana específica - reagente de Coombs
- Suspensão de eritrócitos teste (*EriScan*)

**Procedimento**

- Identificar os Cards ScanGel
- Retirar a totalidade da lingueta de alumínio dos *Cards ScanGel*
- Ressuspender os eritrócitos teste (*EriScan*) antes da sua utilização
- Adicionar 50 µl da suspensão de eritrócitos teste a cada poço dos microtubos correspondentes

- Adicionar imediatamente 25 µl de soro a analisar a cada poço dos microtubos correspondentes
- Incubar durante 15 minutos a 37°C
- Centrifugar durante 10 minutos
- Ler as reações nos microtubos

**Interpretação do Resultado:**

Os glóbulos vermelhos não aglutinados concentram-se no fundo do microtubo (Resultado negativo).

A presença de eritrócitos aglutinados (à superfície ou dispersos no gel) ou de hemólise corresponde a um resultado positivo.

## **Imunologia e Endocrinologia**

A imunologia, como o nome sugere, é a ciência responsável pelo estudo de mecanismos fisiológicos complexos (sistema imunitário) que tem como uma das suas principais funções a discriminação entre o “*self*” e o “*non-self*” (8). São vários os desafios que microorganismos, células estranhas, células sanguíneas transfundidas entre outros provocam no nosso organismo (3). É portanto evidente que o sistema imunitário é crucial à sobrevivência humana. Na ausência de um sistema imunitário capaz, infeções leves podem afetar gravemente o hospedeiro e se mostrar fatais. O maior triunfo da Imunologia foi sem dúvida a vacinação ou imunização. Este procedimento fez com que uma doença severa seja prevenida através de uma exposição prévia ao agente infeccioso (9).

No laboratório de análises clínicas estas duas grandes áreas surgem associadas uma vez que os equipamentos utilizados para dosear ou quantificar compostos são maioritariamente os mesmos.

Ao iniciar funções nestas áreas, o estagiário passou pelas fases pré-analítica (observando as técnicas de colheita, tratamento, preparação para análise e conservação das amostras biológicas), analítica (acompanhamento e manutenção de técnicas, execução e validação analítica das análises imunológicas e endocrinológicas efetuadas no laboratório, bem como realização e avaliação do controlo interno de qualidade) e pós-analítica (acompanhou, com a sua orientadora, a validação biopatológica e a avaliação externa da qualidade).

### **11. Controlo de Qualidade em Imunologia e Endocrinologia**

O laboratório Hemobiolab utiliza, nas áreas da Imunologia e Endocrinologia, controlos fornecidos pelas casas comerciais dos aparelhos. Os dados são registados e analisados diariamente com base nas cartas de controlo apresentadas pelo *software* dos equipamentos.

O Programa de Avaliação Externa da Qualidade permite avaliar a exatidão, para os parâmetros de Imunologia e Endocrinologia realizados no laboratório enquanto que o Programa de Controlo de Qualidade Interno permite avaliar o grau de precisão das diferentes técnicas montadas. O grau de confiança nos resultados está dependente de um controlo de qualidade interno implementado corretamente.

## 12. Equipamentos e Princípios de Instrumentação

No Hemobiolab, as áreas da Imunologia e Endocrinologia situam-se numa zona denominada de “Core Laboratorial”, equipada da seguinte forma:

- **ADVIA Centaur XP** (Fig.14)



Figura 14 - ADVIA Centaur XP

Este aparelho é utilizado para processar amostras tanto na valência de bioquímica clínica como na valência de imunologia e endocrinologia, no entanto, é muito mais utilizado nesta valência uma vez que realiza processos enzimáticos de imunoensaios através de quimioluminescência. A forma como processa a amostra já se encontra referido anteriormente (ponto 2).

- **Immolute 2000** (Fig. 15)



Figura 15 - Immolute 2000



O Immulite 2000 é um instrumento automático que realiza imunoensaios por quimioluminescência.

**Amostra:** Soro e plasma

**Método:** Esferas revestidas com anticorpo são dispensadas no tubo de reação, onde vai ocorrer todo o processo de:

- Incubação: Interação entre amostra, reagente e esfera;
- Lavagem: A esfera é lavada sucessivas vezes para remoção da camada não ligada;
- Desenvolvimento do sinal: Quantificação da camada ligada (imunocomplexos) usando um substrato quimioluminescente (dioxetano) para produzir luz.

A quantidade de luz emitida é detetada pelo tubo fotomultiplicador, sendo proporcional à quantidade do analito inicialmente presente na amostra.

- **ZENIT SP** (Fig.16)



**Figura 6 - ZENIT SP**

Este aparelho é um processador automático de microplacas de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) e lâminas de IFA (*Indirect Immunofluorescence*), visando a detecção e quantificação de autoanticorpos em soro humano.

Pode processar duas placas de ELISA e 16 lâminas de IFA, independentemente.

**Amostra:** Soro

**Método:** O equipamento utiliza duas metodologias diferentes:

- **ELISA** - Técnica que utiliza, neste equipamento, placas de superfície inerte com 96 poços onde foram adsorvidos anticorpos, e anticorpo conjugado a uma

enzima, a qual, após agir sobre seu substrato em presença duma substância cromogénica, amplifica a interação do Antígeno-Anticorpo através da formação de cor. A quantificação é efetuada usando 8 canais fotométricos independentes com leituras mono e bicromáticas (450 e 630 nm). A luz detetada é transformada em sinal elétrico e convertida, através do sistema informático do equipamento, em quantidade/concentração de analito.

- **IFA** – A detecção de anticorpos é baseada no princípio da Imunofluorescência indireta. As lâminas estão revestidas com substrato celular inativado. Quaisquer anticorpos específicos presentes na amostra do paciente ligam-se durante a primeira incubação. Após a remoção por lavagem do material não ligado, a presença de anticorpos específicos é detetada usando o conjugado fluorescente IgG anti humano durante a segunda incubação. O excesso do conjugado é então removido. Forma-se um complexo estável constituído pelo anticorpo fluorescente - anticorpo humano - antígeno, que pode ser visualizado com auxílio de um microscópio de fluorescência.

## **13. Imunologia**

### **13.1. Imunoquímica**

#### **13.1.1. Doseamento das Imunoglobulinas**

As imunoglobulinas constituem um grupo de proteínas que são, de modo geral, responsáveis pela remoção de substâncias estranhas ao organismo (tais como bactérias, vírus e toxinas). Foram identificadas cinco grandes classes de imunoglobulinas, que diferem entre si na estrutura e na função, sendo referidas como IgA, IgG, IgM, IgE e IgD. Os principais constituintes séricos são a IgA, a IgG e a IgM. Em casos normais, as imunoglobulinas constituem aproximadamente 20% a 25% do total das proteínas do soro.

##### **13.1.1.1. Imunoglobulina A (IgA)**

**Nota:** A IgA constitui cerca de 15% do total de imunoglobulinas no soro. As formas dimérica e trimérica da IgA são observadas em secreções exócrinas, assim como nas camadas mucosas do intestino e do trato genito-urinário (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Imunoglobulina A<sub>2</sub> (IGA<sub>2</sub>) é um método de imunoturbidimetria intensificada por PEG. A amostra com IgA de origem humana é diluída de forma adequada e feita reagir com anti-soro específico para formar um precipitado que pode ser medido por turbidimetria a 340/694 nm. A concentração de IgA é determinada pelo cálculo de uma curva padrão a partir das normas de absorvância.

#### 13.1.1.2. Imunoglobulina G (IgG)

**Nota:** A Imunoglobulina G (IgG) constitui 75% das imunoglobulinas séricas, sendo portanto a que representa a maior percentagem de anticorpos no sangue (2). Há quatro subtipos distintos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Estes subtipos diferenciam-se de acordo com a estrutura, a capacidade de fixar complementos, a capacidade de transportar através da placenta e os tempos de semivida. É a única imunoglobulina que pode atravessar a placenta sendo responsável pela proteção do recém-nascido nos primeiros meses de vida (1).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** IGG<sub>2</sub> é um método de imunoturbidimetria intensificada por PEG. A amostra com IgG de origem humana é diluída de forma adequada e feita reagir com anti-soro específico para formar um precipitado que pode ser medido por turbidimetria a 340/694 nm. A concentração de IgG é determinada pelo cálculo de uma curva de calibração a partir das absorvâncias dos calibradores.

#### 13.1.1.3. Imunoglobulina M (IgM)

**Nota:** A IgM constitui cerca de 6% da concentração total de imunoglobulinas no soro. É responsável pelo grupo sanguíneo ABO e pelo fator reumatoide. Como é uma imunoglobulina de grandes dimensões (pentamérica) não atravessa a placenta; portanto, geralmente não é encontrada no recém-nascido (1). Está envolvida e é mais eficaz em lidar com bactérias, especialmente, bactérias gram-negativas. Quando

ocorre um aumento de IgM no recém-nascido, que não é normal, indica infecção intra-uterina por rubéola, citomegalovirus ou doença sexualmente transmissível (2).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** IGM\_2 é um método de imunoturbidimetria intensificada por PEG. A amostra com IgM de origem humana é diluída de forma adequada e feita reagir com anti-soro específico para formar um precipitado que pode ser medido por turbidimetria a 340/694 nm. As concentrações de IgM são determinadas pelo cálculo de uma curva padrão a partir das normas de absorvância.

### **13.1.2. Estudo do Complemento**

#### **13.1.2.1. Complemento C3**

**Nota:** A ligação entre anticorpos e antígenos é realizada através de ligações não-covalentes. Essas interações são potencialmente reversíveis e por isso, estão suscetíveis à rutura, especialmente quando os anticorpos apresentem baixa afinidade. Em vez de ocorrer ligações anticorpo-antígeno, por vezes torna-se vantajoso marcar o antígeno para destruição de forma mais permanente. Essa forma é obtida através de um sistema de proteínas sanguíneas a que se dá o nome de sistema complemento ou simplesmente, complemento. O fator C3 do complemento é essencial para a ativação das vias clássica e alternativa e a sua concentração e os seus produtos de degradação são indicadores do grau de ativação do sistema (9). A medição dos níveis de C3 complementar é importante na suspeita de redução anormal das concentrações de componentes do complemento individuais, nefrite, na determinação de deficiências hereditárias ou adquiridas e é útil para avaliar a atividade da doença no LES (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** C3 Complementar (C3) é um método imunoturbidimétrico intensificado por PEG. Faz-se reagir a amostra com um tampão contendo um anticorpo específico para o C3 Complementar de origem humana ( $\beta_1$  C-globulina). A absorvância (340/694 nm) da solução turva resultante é proporcional à concentração de C3 na amostra. A

concentração de C3 na amostra pode ser determinada pelo cálculo de uma curva padrão a partir das normas de absorvância.

#### 13.1.2.2 Complemento C4

**Nota:** O fator C4 participa na ativação do sistema do complemento pela via clássica sendo sintetizado no tecido pulmonar e ósseo. O seu doseamento tem interesse na monitorização e diagnóstico de doenças do complexo imune. A medição dos níveis de C4 Complementar é solicitado para confirmar angiodema hereditário se o inibidor C1 estiver reduzido (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** C4 Complementar (C4) é um método imunoturbidimétrico intensificado por PEG. Faz-se reagir a amostra com um tampão contendo um anticorpo específico para o C4 complementar de origem humana ( $\beta_1$  E-globulina). A absorvância (340/694 nm) da solução turva resultante é proporcional à concentração de C4 na amostra. A concentração de C4 na amostra é determinada pelo cálculo de uma curva padrão a partir das normas de absorvância.

#### 13.1.3. Proteína C Reativa

**Nota:** A proteína C reativa (PCR) é uma das proteínas mais sensíveis de fase aguda sendo sintetizada pelo fígado, sendo no entanto, inespecífica. A sua síntese é iniciada por imunocomplexos, bactérias, fungos ou traumatismo não ocorrendo aumento da sua concentração em infeções virais. Interage com o complemento, tornando-se um ativador da via clássica e inicia a opsonização, fagocitose e lise das células invasoras. A sua concentração encontra-se elevada na presença de necrose tecidular e em doenças inflamatórias agudas, mas não estabelece a sua causa; constitui ainda um indicador mais sensível e mais rápido que a velocidade de sedimentação (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** wrCRP (*wide range C Reactive Protein*) é um método imunoturbidimétrico intensificado por látex. O reagente de látex wrCRP é uma suspensão de partículas de látex de polistireno revestidas com anticorpo anti-PCR. Quando soro ou plasma contendo PCR é misturado com o reagente de látex, ocorre a aglutinação que resulta num aumento da turbidez. Esta turbidez é medida a 571 nm. A concentração de PCR no soro ou plasma é determinada através de uma curva de calibração gerada com os calibradores.

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

#### 13.1.4. $\alpha$ 1 - Antitripsina

**Nota:** A  $\alpha$ 1-antitripsina tem uma atividade antiproteásica, neutralizando endoproteases como a tripsina e a elastase lisossomal, que é libertada durante a fagocitose pelos leucócitos polimorfonucleares. A  $\alpha$ 1-antitripsina é também uma proteína de fase aguda, cuja concentração no plasma aumenta várias vezes, em caso de inflamação aguda ou crónica, no entanto, não é específica quanto à fonte do processo inflamatório. A deficiência de  $\alpha$ 1-antitripsina pode ser genética ou adquirida e está essencialmente ligada a doença pulmonar (e.g. enfisema) e hepática, como cirrose e outras hepatopatias (2).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Alfa-1-Antitripsina (AAT) é detetada por um método de imunoturbidimetria intensificado por PEG. É adicionada a amostra com  $\alpha$ 1-antitripsina ao reagente 1 que contém polietileno glicol e tampão. Segue-se a adição do reagente 2 que contém anti- $\alpha$ 1-antitripsina (humana). A formação de um complexo anticorpo-antigénio resulta num aumento da turbidez que, no ponto final da reação, é medida como a quantidade de luz absorvida a 340 nm. A concentração de AAT numa amostra é determinada utilizando uma curva padrão calculada a partir das normas de absorvância.

### 13.1.5. $\beta_2$ - Microglobulina

**Nota:** Esta pequena proteína encontra-se na superfície das células nucleadas (abundantemente nos linfócitos e monócitos) e em muitas linhas celulares tumorais. Apresenta uma relação estrutural com as imunoglobulinas. O aumento inespecífico desta proteína é encontrado em condições inflamatórias e em doenças linfoproliferativas. Devido ao seu baixo peso molecular, 95% de toda a  $\beta_2$ -microglobulina livre é rapidamente eliminada por filtração glomerular e, deste filtrado, 99% é reabsorvido no túbulo proximal, seguindo-se a degradação dos aminoácidos. Assim, este teste pode ser usado para diferenciar a disfunção glomerular da disfunção tubular. Na disfunção glomerular, esta proteína está aumentada no soro e diminuída na urina, quando ocorrem distúrbios tubulares, está diminuída no soro e aumentada na urina (1).

**Amostra:** Soro e urina

**Equipamento:** Immulite 2000

**Método:**  $\beta_2$ -Microglobulina é detetada por um método imunométrico em fase sólida quimioluminescente.

### 13.1.6. Fator Reumatóide

**Nota:** Os fatores reumatóides são auto-anticorpos dirigidos contra a parte Fc da IgG. A maioria dos fatores reumatóides são IgM, mas podem ser IgG ou IgA. As condições que podem dar origem a este tipo de fatores são problemas reumáticos e processos inflamatórios crónicos. A prevalência do fator reumatóide aumenta com a idade, em populações saudáveis e por isso pode apresentar resultados falsos positivos em idosos. Este fator pode também ser associado a outras doenças inflamatórias reumatismais e não reumatismais como o LES ou Síndrome de Sjogren e verifica-se, esporadicamente a sua presença em pacientes com tuberculose, hepatite crónica, etc (2).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** Factor reumatóide (RF) é detetado por um método de Imunoturbidimetria intensificado por látex. O reagente de látex para o fator reumatóide é uma suspensão

de partículas de látex polistireno revestidas com IgG de origem humana. Quando o soro contendo fator reumatóide é misturado com o reagente de látex, ocorre a aglutinação que resulta num aumento da turbidez. Esta turbidez pode ser medida a 571 nm. A concentração de fator reumatóide no soro é determinada a partir da curva de calibração gerada com um conjunto de calibradores.

### **13.2. Autoimunidade**

Os auto-anticorpos são anticorpos produzidos por um indivíduo contra os seus próprios constituintes ("self"). A resposta imune é dirigida contra constituintes normais do organismo, resultando exacerbada e produzindo morbidade e até mortalidade no indivíduo. Estes intitulados auto-anticorpos são muitas vezes específicos de uma determinada patologia. As patologias reumáticas sistêmicas são transtornos autoimunes e englobam por exemplo o lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide, doença mista do tecido conjuntivo, Síndrome de Sjogren, esclerodermia, Síndrome de CREST, polimiosite e dermatomiosite. Uma característica geral das doenças reumáticas sistêmicas (DRS) é a presença de anticorpos circulantes a diversos antígenos celulares. A detecção e a caracterização serológica de auto-anticorpos específicos desempenham um papel importante no diagnóstico diferencial destas doenças (1).

#### **13.2.1. Anticorpos antinucleares (ANA)**

**Nota:** Os autoanticorpos contra antígenos nucleares (ANA's) são um grupo de anticorpos altamente específicos para antígenos nucleares incluindo Sm, RNP, Ro-SSA, La-SSB, Scl-70, Jo-1, dsDNA, histonas e centrómeros. Um teste ANA positivo fornece uma evidência presuntiva de uma doença reumática sistêmica (DRS), sendo depois necessária uma posterior definição do perfil de anticorpos positivos. Um resultado negativo reduz, mas não exclui, a probabilidade de DRS (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Zenit SP

**Método:** Anticorpos doseados em ensaios quantitativos por ELISA.



### **13.2.2. Anticorpos Anti-Sm**

**Nota:** O antígeno Smith (Sm) é uma glicoproteína não histona. Os anticorpos contra este antígeno nuclear extraível são marcadores serológicos específicos de LES. Os níveis desses anticorpos podem variar com o decorrer do tempo e o curso da doença uma vez que estão relacionados com a atividade da doença (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Zenit SP

**Método:** Anticorpo Anti-Sm é doseado por ensaio quantitativo por ELISA.

### **13.2.3. Anticorpos Anti-nRNP**

**Nota:** O antígeno RNP é uma ribonucleoproteína. Os anticorpos contra o mesmo são encontrados em várias doenças do tecido conjuntivo, principalmente no LES (35-40%) e na DMTC – Doença Mista do Tecido Conjuntivo (>95%). A DMTC apresenta uma combinação de características clínicas, que também podem observar-se no LES, na poliomiosite e na esclerodermia. Embora os sintomas clínicos da DMTC se assemelhem a LES esta não é acompanhada por envolvimento renal (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Zenit SP

**Método:** Anticorpos Anti-RNP são doseados por ensaios quantitativos por ELISA.

### **13.2.4. Anticorpos Anti-SS-A/Ro e Anticorpos Anti-SS-B/La**

**Nota:** Os anticorpos anti-SS-A são dirigidos contra o antígeno Ro (pequena proteína citoplasmática). Os anti-SS-B são dirigidos contra partículas proteicas do RNA, que parecem participar como cofatores da RNA Polimerase. A presença dos anticorpos anti-SS-B é geralmente acompanhada pela presença de anti-SS-A e estão associados a patologias como o Síndrome de Sjogren, e LES, mas com menor prevalência (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Zenit SP

**Método:** Anticorpos doseados por ensaio quantitativo por ELISA.

#### **13.2.5. Anticorpos Anti-Scl-70**

**Nota:** A proteína Scl-70 é um importante auto-antígeno, resultante da degradação da DNA Topoisomerase I. O anticorpo contra esta proteína é específico contra a Esclerodermia (Esclerose Sistêmica) (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Zenit SP

**Método:** Anticorpo doseado por ensaio semi-quantitativo por ELISA.

#### **13.2.6. Anticorpos Anti-Jo-1**

**Nota:** Os anticorpos anti-Jo-1 estão direcionados para a Histidil tRna-sintetase (Jo-1). Os títulos de anti-Jo-1 variam em concordância com a atividade da miosite e tem sido sugerido que a quantificação pode ser útil na avaliação clínica desses pacientes, principalmente com fibrose intersticial e poliartrite simétrica (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Zenit SP

**Método:** Anticorpos doseados por ensaio semi-quantitativo por ELISA.

#### **13.2.7. Anticorpos Anti-dsDNA**

**Nota:** Os anticorpos contra dsDNA são altamente específicos para LES e detetam-se com grande frequência em doentes não tratados com doença ativa. A presença de anticorpos dsDNA no LES, é um dos critérios para a classificação da doença segundo a ARA (*American Rental Association*). Este teste, além de fornecer um diagnóstico, permite a monitorização da atividade da doença e da resposta ao tratamento, e estabelece um prognóstico para o LES (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Zenit SP

**Método:** Anticorpos doseados por ensaio quantitativo por ELISA.

### **13.2.8. ENA**

**Nota:** O ENA é um teste utilizado para a pesquisa de anticorpos com especificidade para antígenos de extração nuclear. Um resultado positivo sugere a presença de um ou mais auto-anticorpos dirigidos aos antígenos nucleares extraíveis (Anti-nRNP, Anti-Sm, Anti-SS-A, Anti-SS-B, Scl 70, Jo-1) (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Zenit SP

**Método:** Anticorpos doseados em ensaios semi-quantitativos por ELISA.

### **13.2.9. Anticorpos Anti-Tiroglobulina (aTG)**

**Nota:** A tiroglobulina é produzida unicamente pela glândula tiróide e é o componente maioritário do colóide folicular da tiróide. As hormonas tiroideias T3 e T4 são sintetizadas a partir da tiroglobulina. Os auto-anticorpos para a tiroglobulina (aTG) estão presentes com grande frequência em pacientes com doenças autoimunes da tiróide (1).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA e heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** Anti-Tg é um método imunológico competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescente direta. O auto-anticorpo da tiroglobulina na amostra do doente compete com o anticorpo policlonal anti-Tg humano ligado a um anticorpo policlonal anti-humano de cabra ligado por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida por uma quantidade limitada de tiroglobulina humana marcada com éster de acridina no Reagente Lite. Existe uma relação inversa entre a quantidade de anti-Tg presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

### 13.2.10. Anticorpos Anti-Peroxidase (aTPO)

**Nota:** Os anticorpos antiperoxidase da tiróide são auto-anticorpos direcionados contra a enzima peroxidase da tiróide. Esta enzima cataliza a iodonação da tiroxina na tiroglobulina, durante a biossíntese da T3 e T4 (1).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA e heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** anti-TPO é um método imunológico competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescente. O auto-anticorpo da peroxidase da tiróide na amostra do doente compete com o anticorpo monoclonal anti-TPO de rato ligado por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida por uma quantidade limitada de TPO humana em complexo com um anticorpo monoclonal anti-TPO de rato marcado com éster de acridina no Reagente Lite. Existe uma relação inversa entre a quantidade de anti-TPO presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

## 13.3. Imunoserologia

### 13.3.1. Hudlesson

**Nota:** Reação de aglutinação que permite confirmar uma brucelose. A infeção por *Brucella spp* é adquirida pelo Homem através do contacto com carcaças de animais ou peles e também pela ingestão de leite e derivados não pasteurizados de animais infetados (10).

**Amostra:** Soro

**Método:** Ensaio de aglutinação em látex. O teste depende da capacidade do anticorpo presente no soro do paciente, para aglutinar os antígenos bacterianos (*Brucella abortus*). Quando ocorre, os agregados tornam-se visíveis, em objetiva de baixa ampliação (10X).

### 13.3.2. Paul Bunnell

**Nota:** Paul Bunnell é um teste rápido de aglutinação para a pesquisa e análise semiquantitativa dos anticorpos heterofílicos associados à mononucleose infecciosa (MI). A deteção de anticorpos heterófilos é possível, 5 a 10 dias após manifestação

dos primeiros sintomas clínicos da patologia. Os anticorpos são detetáveis, na maior parte dos casos, por 8 a 10 semanas. A MI envolve o tecido retículo endotelial e acredita-se que seja provocada pelo vírus Epstein Barr. Paul e Bunnell demonstraram que os anticorpos da MI aglutinavam os eritrócitos de ovelha e cavalo. Este teste permite um diagnóstico diferencial entre mononucleose infecciosa e doenças por influenza, rubéola ou hepatite (10).

**Amostra:** Soro

**Método:** Ensaio de aglutinação em látex. Na presença de anticorpos heterofílicos típicos da mononucleose, dá-se uma reação com os eritrócitos de cavalo pré-tratados, tornando-se visível a aglutinação. Em caso negativo, a suspensão permanece homogénea.

#### 13.3.3. Anticorpo anti estreptolisina O (ASO)

**Nota:** A estreptolisina O é uma proteína hemolítica antigénica e a deteção de anticorpos específicos é uma prova serológica utilizada para detetar infeções anteriores por *Streptococcus pyogenes*. Este teste não permite o diagnóstico de infeções agudas causadas pela bactéria (1).

**Amostra:** Soro e plasma (heparina de lítio)

**Equipamento:** ADVIA 1800

**Método:** ASO<sub>2</sub> é um método imunoturbidimétrico intensificado por látex, baseado no princípio de que a concentração do analito é função da intensidade da dispersão de luz originada por agregados de látex. Num indivíduo infetado por estreptococcus de grupo A, são normalmente produzidos anticorpos da estreptolisina-O, a exotoxina estreptocócica. Na reação entre as partículas de látex uniformes suspensas revestidas com estreptolisina-O e os anticorpos da ASO no soro ou plasma, ocorre um aumento da turbidez. Fazendo a comparação dos resultados com uma norma, obtém-se um valor quantitativo da concentração de ASO presente na amostra.

#### 13.3.4. VDRL

**Nota:** A Sífilis é causada pela bactéria *Treponema pallidum* e é normalmente adquirida por contacto sexual, podendo também ser transmitida por sangue infetado. É uma

infecção crónica que progride através de diferentes fases: sífilis primária, secundária, terciária e quaternária. Estes estados produzem diferentes sintomas clínicos, inicialmente produzindo as lesões cancróides típicas, depois um *rash* que pode ser seguido por um longo período de dormência que pode concluir-se em problemas cardiovasculares e neurosífilis. O VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*) é um teste não-treponémico facilmente quantificável e, por isso, é o teste de escolha para o seguimento terapêutico, no entanto pode haver resultados negativos para sífilis avançada e falsos positivos biológicos (1).

**Amostra:** Soro

**Método:** Aglutinação em placa. São usadas partículas de carbono revestidas com antígeno cardiolipina, para detetar anticorpos reaginas, presentes no soro de pessoas com sífilis. As amostras que contêm reaginas causam agregação das partículas de carbono, que aparecem como agregados escuros num fundo claro. A agregação pode ser vista macroscopicamente ou ao microscópio com uma objetiva de 10X.

#### 13.3.5. TPHA

**Nota:** O TPHA (*Treponema pallidum hemagglutination assay*) é um teste de hemaglutinação realizado em placas de microtitulação. É um teste de alta especificidade, confirmatório dos testes não treponémicos, como o VDRL. Os testes para anticorpos não-treponemais são utilizados primariamente na triagem de pacientes e na monitorização da resposta terapêutica durante o tratamento com antimicrobianos para a sífilis, no entanto, um resultado positivo para VDRL num paciente não tratado para sífilis deve ser confirmado por testes para anticorpos anti-treponema (3).

**Amostra:** Soro

**Método:** Hemaglutinação em placa de microtitulação. O teste é baseado na deteção de anticorpos específicos anti-*Treponema pallidum*, por hemaglutinação passiva. Os soros dos pacientes, com anticorpos anti-T. pallidum aglutinam as hemácias de ave sensibilizadas, formando uma massa homogénea no poço da placa de microtitulação; caso contrário formar-se um botão no fundo do poço.

### 13.3.6. Weil-Félix

**Nota:** A reação de Weil-Félix deteta uma infecção causada pela bactéria *Rickettsia* (e outras aparentadas) que causam febres altas. As *Rickettsias* são os agentes etiológicos do tifo e das febres exantemáticas. São habitualmente transmitidos ao Homem por intermédio de uma picada de um artrópode. Este ensaio baseia-se na reação cruzada que existe entre os antígenos de algumas *Rickettsias* e estirpes selecionadas de *Proteus* (*Proteus* OX2, OX19 e OXK) (10).

**Amostra:** Soro

**Método:** Ensaio de aglutinação em látex. O teste depende da capacidade do anticorpo presente no soro do paciente, para aglutinar os antígenos bacterianos (*Proteus* OX2 e *Proteus* OX19). Quando ocorre, os agregados tornam-se visíveis em objetiva de baixa ampliação (10X).

### 13.3.7. Widal

**Nota:** Este teste serológico permite determinar a presença de bactérias do género *Salmonella*. *Salmonella spp* causa pertence à família *Enterobacteriaceae* e possui várias espécies. Teste aconselhado a pacientes que apresentem sintomas clínicos de febre tifóide ou de brucelose (10).

**Amostra:** Soro

**Método:** Ensaio de aglutinação. O teste depende da capacidade do anticorpo presente no soro do paciente, para aglutinar os antígenos bacterianos (*Salmonella typhi* O, *Salmonella typhi* H, *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella paratyphi* B). Quando ocorre, os agregados tornam-se visíveis em objetiva de baixa ampliação (10X).

### 13.3.8. Waaler Rose

**Nota:** Waaler Rose é um teste rápido em lâmina para a deteção do fator reumatoide (FR). Este pode ser encontrado no soro dos doentes com artrite reumatoide e supõe-se ser constituído por anticorpos IgM anti-IgG do doente. Devido à variedade de fatores reumatoides não existe nenhum teste capaz de detetar todos eles (10).

**Amostra:** Soro

**Método:** Ensaio de hemaglutinação. O antígeno, uma suspensão de eritrócitos de carneiro estabilizados e sensibilizados com gamaglobulinas de coelho anti-carneiro, aglutina na presença de fator reumatóide presente no soro do paciente.

#### 13.3.9. Anticorpo Anti-Toxoplasmose (IgM e IgG)

**Nota:** O *Toxoplasma gondii*, protozoário, parasita intracelular obrigatório, é um organismo patogénico bastante frequente no homem que causa Toxoplasmose. O parasita, cujo hospedeiro definitivo é o gato, é disseminado na natureza e infeta outros mamíferos (roedores, bovinos, caprinos e suínos). A doença é transmitida ao homem por carne crua ou mal cozinhada, contendo pseudoquistos, ou por oocistos (provenientes das fezes de gatos infetados) presentes em frutas ou legumes crus. A infeção no homem é geralmente assintomática e benigna no sujeito imunocompetente mas durante a gravidez pode produzir anomalias congénitas graves no feto, em especial lesões cerebrais. A transmissão materno-fetal resulta da passagem transplacentária de *T. gondii* durante a fase aguda da doença. O diagnóstico de uma infeção por *T. gondii* baseia-se essencialmente na deteção de anticorpos específicos (IgM e IgG). O diagnóstico de uma infeção aguda adquirida durante a gravidez far-se-á pela deteção de uma seroconversão ou por um aumento significativo do título de anticorpos detetados em duas colheitas sequenciais testadas em paralelo (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Immulite 2000

**Método:** Anticorpo detetado por um método imunométrico em fase sólida quimioluminescente.

#### 13.3.10. Anticorpo Anti-Rubéola (IgM e IgG)

**Nota:** A infeção pelo vírus da Rubéola, nas crianças e nos adultos, é benigna e de curta duração, apresentando-se com adenopatias, febre, erupção maculopapular e um mal-estar geral. No entanto, pode ter consequências muito graves para o feto se for contraída por uma mulher grávida, sobretudo se a infeção ocorrer durante os três primeiros meses de gravidez. A infeção aguda é diagnosticada pela deteção das IgM específicas do vírus e a verificação do estado imunitário é determinado pelas IgG específicas. No caso de deteção positiva das IgG anti-Rubéola, o diagnóstico deverá



ser preciso (primoinfeção ou imunização) procurando numa segunda colheita efetuada 3 semanas mais tarde, um aumento ou uma estabilização do título das IgG, avaliando em conjunto com as IgM específicas, em que, a sua presença está, na maioria dos casos, correlacionada com uma primoinfeção recente (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Immulite 2000

**Método:** Anticorpos doseados por um método imunométrico em fase sólida quimioluminescente.

### **13.3.11. Anticorpo anti-CMV (IgM e IgG)**

**Nota:** O citomegalovírus (CMV) é um vírus onnipresente que faz parte da família dos herpes vírus podendo persistir no hospedeiro como uma infeção crónica ou latente. Nas crianças e adultos imunodeprimidos pode ser a causa de patologias graves. Em pessoas saudáveis, a infeção é normalmente assintomática, mas pode produzir uma doença gripal autolimitada. Esta é a infeção intra-uterina mais comum afetando cerca de 1% dos recém-nascidos, contudo, só 10% apresentam sintomas como icterícia, hepatoesplenomegalia e pancitopenia, podendo apresentar mais tarde sequelas neurosensoriais como surdez ou cegueira parcial ou total. A deteção das IgG e IgM anti-CMV é útil no diagnóstico das infeções primárias recentes, particularmente na mulher grávida e ajuda à avaliação do estatuto imunitário dos pacientes. As IgM anti-CMV, presentes em cerca de 70% das primoinfeções, persistem, em geral, 16 a 20 semanas após a infeção e podem, novamente aparecer de forma inconstante, durante reativações (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Immulite 2000

**Método:** Anticorpo doseado por um método imunométrico em fase sólida quimioluminescente.

### 13.3.12. HIV 1/2

**Nota:** O vírus de imunodeficiência humana é o agente causador da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). A SIDA foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos em 1981 e tornou-se uma das principais causas de morte em todo o mundo. Apesar dos esforços educativos direcionados para a redução da transmissão da SIDA e para o aumento dos avanços no tratamento, o número de casos continua a aumentar. O vírus de imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) foi identificado como a causa principal deste síndrome. Este retrovírus é disseminado por contactos sexuais, exposição a sangue ou produtos sanguíneos infectados e transmissão perinatal. Em 1986, o vírus de imunodeficiência humana tipo 2 (HIV-2) foi isolado em doentes com SIDA na África Ocidental. Estes vírus partilham epítomos das proteínas nucleares, mas mostram pouca ou nenhuma reatividade cruzada com as glicoproteínas do invólucro. A comparação das sequências de ácidos nucleicos entre o HIV-1 e o HIV-2 mostra cerca de 60% de homologia nos genes conservados, como gag e pol (proteínas nucleares codificadoras), e 30 a 40% de homologia em regiões menos conservadas (proteínas do invólucro codificadoras). As vias de transmissão do HIV-1 e HIV-2 são as mesmas. No entanto, nas infeções por HIV-2, as taxas de transmissão e de replicação do vírus são mais baixas. Estudos clínicos têm mostrado que nas infeções por HIV-2 há uma progressão mais lenta da doença do que nas infeções por HIV-1. Nas infeções por HIV-2, há uma taxa mais lenta no declínio das células T CD4 e uma virémia reduzida. Os indivíduos infectados com HIV-2 têm, geralmente, um melhor resultado clínico.

**Amostra:** Soro, plasma (EDTA e heparina de lítio).

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** CHIV (ensaio combinado de Ag/Ac do HIV) é um método quantitativo imunológico de quimioluminescência. Este imunoensaio, do tipo sanduíche, efetua duas lavagens com antígenios/anticorpos, através do qual os antígenios são ligados pelo anticorpo presente na amostra do doente e o antígeno (p24) na amostra é ligado pelo anticorpo presente nos reagentes. A Fase Sólida contém um complexo preformado de micropartículas paramagnéticas revestido com estreptavidina e antígenios recombinantes biotinilados de HIV-1 e HIV-2, o antígeno peptídico do Grupo O e o anticorpo anti-p24 biotinilado. Este reagente é utilizado para capturar anticorpos anti-HIV-1 e/ou anti-HIV-2 e/ou o antígeno p24 do HIV na amostra do doente. O Reagente Lite Auxiliar e o Reagente Lite contêm antígenios recombinantes de HIV-1 e HIV-2 marcados com éster de acridina, o antígeno peptídico do Grupo O e o anticorpo anti-p24 marcado com éster de acridina utilizados para detetar anticorpos

anti-HIV-1 e/ou anti-HIV-2 e/ou o antígeno p24 ligados à Fase Sólida na amostra. Existe uma relação direta entre o volume de atividade do anticorpo do HIV e/ou do antígeno p24 do HIV presente no espécime e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema. Determina-se um resultado reativo ou não reativo de acordo com o Valor de Índice estabelecido com os calibradores.

### **13.3.13. Hepatite A (HAV)**

**Nota:** A Hepatite A é causada pela infecção com o vírus da hepatite A (HAV). A transmissão deste vírus é feita pela via fecal-oral e a infecção ocorre principalmente devido à ingestão de alimentos contaminados ou a fracas condições sanitárias. O HAV é replicado no fígado, excretado na bÍlis e transportado nas fezes. O período médio de incubação para a infecção pelo HAV é de 30 dias com um intervalo de 15 a 40 dias. A ocorrência de infecção crónica não foi registada após infecção pelo HAV. Os sintomas duram aproximadamente 2 semanas e incluem hepatomegalia, icterícia, urina escura, fadiga e perturbações gastrointestinais, designadamente anorexia, náuseas, vómitos e dores abdominais, sendo o seu anticorpo detetado após o aparecimento dos sintomas. A resposta precoce do anticorpo inclui de forma substancial a subclasse do anticorpo IgM. O anti-HAV IgM é detetado normalmente durante 3 a 6 meses após os sintomas da doença, apesar de o anti-HAV IgG poder persistir indefinidamente. A determinação específica do anti-HAV IgM é o marcador serológico mais útil no diagnóstico de uma infecção aguda pelo HAV. O anti-HAV total é utilizado principalmente para a determinação de exposição prévia ou recuperação de HAV (1).

#### **13.3.13.1. Anticorpo anti-HAV total**

**Nota:** A deteção da atividade de anti-HAV total é utilizada para identificar indivíduos suscetíveis e para determinar a aquisição de imunidade após a vacinação. Este ensaio deteta todas as classes de anticorpos contra o vírus da hepatite A (1).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA e heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** HAV Total é um método quimioluminescente direto competitivo. O imunoensaio é composto por três passos de adição de reagente e incubação. Primeiro, a amostra é pré-tratada com o Reagente Auxiliar, contendo cisteína. Em

seguida, o antígeno HAV é adicionado ao poço auxiliar (Reagente de Antígeno). É então adicionado o Reagente Fluorescente e a Fase Sólida. O Reagente Fluorescente contém um anticorpo de rato monoclonal para o antígeno HAV marcado com éster de acridínio e um fragmento biotinilado Fab de um anticorpo de rato monoclonal para o antígeno HAV. A Fase Sólida contém estreptavidina covalentemente ligada a partículas paramagnéticas. Após incubação final, o complexo imunitário formado é lavado com água antes da iniciação da reação de quimioluminescência. Existe uma relação inversa entre a quantidade de HAV presente na amostra do doente e a quantidade de unidades de luz relativa (RLUs) detetadas no sistema.

#### 13.3.13.2. Anticorpo anti-HAV IgM

**Nota:** Devido à produção transitória de anti-HAV IgM, a sua presença no soro indica a existência de uma infecção aguda ou infecção recente. Uma vez que as infecções virais sintomáticas pela Hepatite A podem ser clinicamente iguais às infecções virais pela Hepatite B ou C, o teste serológico é importante para um diagnóstico correto (2).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA e heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** HAV IgM é um imunoensaio quimioluminescente de captura de IgM utilizando o formato de 2 passos. No primeiro passo, a amostra é diluída utilizando o Multi-Diluyente 2. Após a diluição da amostra, é adicionado o anticorpo monoclonal IgM biotinilado na cuvette de IgM ligada com a amostra diluída do doente. O complexo IgM é então capturado pela adição de partículas de látex magnéticas revestidas com estreptavidina (MLP). O IgM-MLP é lavado e novamente suspenso. No segundo passo, o anti-HAV IgM capturado na fase sólida é detetado pela adição sequencial do antígeno HAV e do anticorpo anti-HAV de rato marcado com éster de acridínio. Existe uma relação direta entre o volume de atividade do anti-HAV IgM presente na amostra do doente e a quantidade de unidades de luz relativa (RLUs) detetadas pelo sistema. Um resultado reativo ou não reativo é determinado de acordo com o valor de "*Signal-to-Cutoff*" estabelecido com os calibradores.

#### 13.3.14. Hepatite B (HBV)

**Nota:** O vírus da hepatite B (HBV) possui um período de incubação médio variando de 6 a 8 semanas (intervalo entre 1 a 6 meses). Os sintomas clínicos comuns incluem mal-estar, febre, gastroenterite e icterícia. A infecção pelo HBV pode resultar em hepatite icterica típica, hepatite anictérica subclínica, hepatite fulminante ou hepatite crônica ou persistente. Nos adultos, 90 a 95% dos doentes com infecção pelo HBV recuperam completamente da doença aguda e o vírus desaparece. Aproximadamente 5 a 10% dos doentes com o HBV tornam-se portadores crônicos. Nos recém-nascidos infectados pelo HBV, aproximadamente 90% desenvolvem hepatite B crônica. A infecção pelo HBV, especialmente em casos de infecção crônica, está claramente associada ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (2).

##### 13.3.14.1. Antigénio HBs (AgHBs)

**Nota:** O antígeno de superfície da Hepatite B (AgHBs) é um marcador serológico identificativo da infecção aguda ou crônica de hepatite B. O AgHBs é o primeiro antígeno a aparecer a seguir à infecção pelo vírus da hepatite B e é geralmente detectado 1 a 10 semanas antes do aparecimento de sintomas clínicos. Os ensaios do AgHBs são normalmente utilizados para diagnosticar infecções suspeitas pelo HBV e para monitorizar o estado de indivíduos infectados, com vista a determinar se a infecção desapareceu ou se o doente se tornou um portador crônico do vírus. Nos doentes que recuperam da infecção pelo HBV, os níveis de AgHBs desaparecem 3 a 5 meses após o aparecimento da infecção. Nos doentes com infecção crônica pelo HBV, os níveis de AgHBs mantêm-se detetáveis toda a vida. Além disso, os ensaios do AgHBs são utilizados para avaliar a eficácia de medicamentos antivirais, monitorizando os níveis de AgHBs no soro ou plasma do doente. Tem-se recomendado o rastreio pré-natal ao AgHBs de modo a que os recém-nascidos de mães portadoras do HBV possam obter tratamento profilático (2).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA e heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** HBsAgII é um imunoensaio do tipo sanduíche que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta. O Reagente Auxiliar, contendo anticorpos de captura monoclonais biotinilados anti-HBs de ratinho e um anticorpo monoclonal marcado com éster de acridina anti-HBs de ratinho, é adicionado à amostra. O AgHBs da amostra

conjuga-se com os anticorpos. É adicionado a partir do reagente principal um segundo anticorpo monoclonal marcado com éster de acridina anti-HBs de ratinho. As partículas magnéticas de látex revestidas com estreptavidina na Fase Sólida capturam os complexos AgHBs-anticorpo. A amostra é incubada com o Reagente Auxiliar, e depois com a Fase Sólida e o Reagente Lite. O complexo anticorpo-antigénio forma-se se o antigénio de superfície da hepatite B estiver presente na amostra. Existe uma relação direta entre o volume de atividade do AgHBs presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema. Determina-se um resultado positivo ou negativo de acordo com um *cutoff* do Valor de Índice de 1,0 estabelecido com os calibradores.

#### **13.3.14.2. Anticorpo anti-HBs (AcHBs)**

**Nota:** A presença do anticorpo do antigénio de superfície da Hepatite B (anti-HBs) é utilizada para determinar o estado imunitário relativamente ao HBV ou a progressão da doença em indivíduos infetados pelo HBV. Um aumento nos níveis de anti-HBs, juntamente com a perda de antigénio de superfície da hepatite B (AgHBs) detetável em circulação, denota a convalescença nas infeções de Hepatite B. Além disso, os níveis de anti-HBs podem ser medidos para determinar se é necessária a vacinação ou, após um regime de vacinação, para determinar se a imunidade protetora foi alcançada (2).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA e heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** Anti-HBs2 é um imunoensaio do tipo sanduíche que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta. Os AgHBs (subtipos ad e ay) estão ligados por covalência a partículas magnéticas de látex na Fase Sólida. No Reagente Lite, o AgHBs (subtipos ad e ay) está marcado com éster de acridina. São adicionadas partículas de látex não magnéticas a partir do recipiente auxiliar. A amostra é incubada simultaneamente com o Reagente Lite, a Fase Sólida e o Reagente Auxiliar. O complexo anticorpo-antigénio forma-se se o anti-HBs estiver presente na amostra. Existe uma relação direta entre a quantidade de atividade de anti-HBs presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### 13.3.14.3. Anticorpo anti-HBc IgM (AcHBc, IgM)

**Nota:** Os títulos de anti-HBc IgM aumentam rapidamente, atingem o seu pico durante o estado de infeção aguda da infeção pelo HBV e a seguir diminuem para um nível relativamente baixo à medida que o doente recupera ou se torna um portador crónico. Os títulos de anti-HBc IgM são bastante úteis no diagnóstico de infeção aguda pelo HBV mesmo quando as concentrações de AgHBs são inferiores à sensibilidade do ensaio de diagnóstico. O anti-HBc IgM pode ser o único marcador específico para o diagnóstico de infeção aguda de HBV. A utilização de outros marcadores virais tais como o AgHBs, anti-HBs e anti-HBc total para diferenciar a Hepatite B crónica da aguda é inconclusiva, dado que a maior parte destes marcadores também são observados nas infeções crónicas (2).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA e heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** HBc IgM é um imunoensaio quimioluminométrico de captura do IgM que utiliza um formato dividido em duas etapas. O reagente auxiliar contém IgM anti-humano biotinilado. A fase sólida contém micropartículas revestidas com estreptavidina. No reagente Lite, o antígeno HBc recombinante é combinado com o anti-HBc marcado com éster de acridínio. A amostra é incubada com o reagente auxiliar. A seguir é adicionada a fase sólida e as micropartículas revestidas com estreptavidina na fase sólida ligam o IgM. Após uma etapa de lavagem, é adicionado o reagente Lite. Se o anti-HBc IgM estiver presente na amostra, formam-se complexos de anticorpo-antígeno. Existe uma relação direta entre o título de anti-HBc IgM presente na amostra do doente e a quantidade de unidades de luz relativas (RLUs) detetada pelo sistema. É determinado um resultado positivo ou negativo de acordo com o valor de coeficiente estabelecido com os calibradores.

#### 13.3.14.4. Anticorpos totais anti-HBc (AcHBc, Total)

**Nota:** O antígeno central da Hepatite B (AgHBc), encontrado em células hepáticas, não circula no sistema vascular. Contudo, os anticorpos IgM e IgG para o AgHBc podem ser detetados serologicamente em indivíduos infetados pelo HBV. O Anti-HBc IgM é detetável primeiro e permanece detetável durante aproximadamente seis meses. Pouco tempo após a resposta do IgM, o anti-HBc IgG aparece e pode permanecer detetável indefinidamente. A presença do anti-HBc IgM é característica da

infecção aguda, enquanto que a presença do anti-HBc IgG é característica de estados crónicos ou de recuperação da infecção pelo HBV. Os ensaios Anti-HBc Total detetam as respostas do IgM e do IgG anti-HBc. Frequentemente os níveis de anti-HBc irão coincidir com os níveis detetáveis de outros marcadores do HBV. Raramente, o anti-HBc pode constituir o único marcador do HBV detetável. Isto pode ocorrer durante um curto período em que o antígeno de superfície da Hepatite B (AgHBs) foi eliminado do sistema vascular e por isso os anticorpos para o antígeno de superfície da Hepatite B (anti-HBs) tornaram-se detetáveis. Por este motivo, não se recomenda a utilização de ensaios anti-HBc Total para detetar infeções agudas. Os ensaios anti-HBc Total devem ser utilizados em conjunto com outros ensaios de marcadores para avaliar a exposição atual ou anterior ao HBV (2).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA e heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** HBc Total é um imunoensaio quimioluminométrico do tipo sanduíche com duplo antígeno através do qual os antígenos são ligados pelo anticorpo presente na amostra do doente. A Fase Sólida contém um complexo pré-formado de micropartículas paramagnéticas revestido com estreptavidina e antígeno HBc recombinante biotinilado e é utilizada para capturar anti-HBc na amostra do doente. O reagente fluorescente contém antígeno HBc recombinante marcado com éster de acridino e é utilizado para detectar anti-HBc na amostra. A fase sólida e o reagente caotrópico são adicionados à amostra, seguidos do reagente auxiliar e do reagente fluorescente. Os complexos anticorpo-antígeno formar-se-ão se os anticorpos anti-HBc (IgM e IgG) estiverem presentes na amostra. Existe uma relação direta entre o nível de anticorpos anti-HBc encontrados na amostra do doente e a quantidade de unidades de luz relativa (ULRs) detetada pelo sistema. É determinado um resultado positivo ou negativo de acordo com o nível de índice estabelecido com os calibradores.

#### **13.3.14.5. Antígeno HBe (AgHBe)**

**Nota:** A deteção do antígeno HBe no soro e no plasma é um indicador de infecção ativa e vírus em replicação. O desaparecimento do AgHBe e o aparecimento do anti-HBe, em conjunto com outros marcadores do HBV, permitem ao clínico determinar um prognóstico e acompanhar a progressão da doença, do estado agudo ao crónico ou ao estado recuperado, bem como monitorizar a terapia antiviral. O ensaio do AgHBe



destina-se a ser utilizado como meio auxiliar de diagnóstico e monitorização para doentes com infeção pelo vírus da Hepatite B, quando utilizado em conjunto com os resultados de outros ensaios de marcadores do HBV (2).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA e heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** HBeAg é um imunoensaio quimioluminométrico do tipo sanduíche de duas lavagens com anticorpos (os anticorpos são ligados por um antigénio presente numa amostra). A Fase Sólida contém um complexo pré-formado de micropartículas revestido com estreptavidina e anticorpo anti-HBe monoclonal biotinilado e é utilizada para capturar o AgHBe na amostra do doente. O Reagente Lite contém anticorpo anti-HBe monoclonal marcado com éster de acridina e é utilizado para detetar AgHBe na amostra. A Fase Sólida é adicionada à amostra, seguida do Reagente Lite. O complexo anticorpo-antigénio forma-se se o AgHBe estiver presente na amostra. Existe uma relação direta entre o volume de atividade do AgHBe presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema. Determina-se um resultado reativo ou não reativo de acordo com um *cutoff* do Valor de Índice de 1,0 estabelecido com os calibradores.

#### 13.3.14.6. Anticorpo HBe (AcHBe)

**Nota:** O anti-HBe aparece pouco tempo depois do fim da fase aguda da infeção pelo HBV e está presente à medida que o doente vai recuperando ou se vai tornando um portador crónico. O anti-HBe já não está presente quando a recuperação da infeção pelo HBV tiver terminado. Embora o anti-HBe possa estar presente com o AgHBs em portadores crónicos, a presença de anti-HBe na ausência de AgHBs constitui uma indicação de recuperação precoce ou contínua. O aparecimento do anti-HBe é indicador da eficácia do tratamento no caso de portadores crónicos do HBV sujeitos a tratamento com medicações antivirais (2).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA e heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** Anti-HBe é um imunoensaio quimioluminométrico competitivo/neutralizante que utiliza um formato de duas etapas com uma única lavagem. O Reagente Auxiliar contém rHBeAg (recombinante) num diluente de amostras. A Fase Sólida contém

micropartículas revestidas com estreptavidina pré-formadas com anticorpo anti-HBe monoclonal biotinilado. O Reagente Lite contém anticorpo anti-HBe monoclonal marcado com éster de acridina. A amostra fica a incubar com o Reagente Auxiliar. Durante esta incubação, o anti-HBe na amostra liga-se ao rHBeAg. A Fase Sólida e o Reagente Lite são adicionados de seguida e ligam qualquer rHBeAg que ainda não esteja ligado pelo anti-HBe da amostra. Após uma etapa de lavagem, a adição de ácido seguido de base produz um *flash* na mistura reagente. Existe uma relação inversa entre a quantidade de atividade de anti-HBe presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema. Determina-se um resultado reativo ou não reativo de acordo com um *cutoff* do Valor de Índice de 1,0 estabelecido com os calibradores.

#### 13.3.15. Hepatite C (HCV)

**Nota:** O HCV é endémico em todo o mundo e constitui um grave problema de saúde. A presença de anticorpos para o HCV indica que um indivíduo poderá ter sido infetado com HCV ou poderá transmitir a infeção. A infeção por HCV é muitas vezes assintomática. No entanto, a maioria (mais de 80%) dos indivíduos expostos tornam-se cronicamente infetados. Em 20% destes, a doença progride para cirrose, insuficiência do fígado e possível carcinoma hepatocelular ou colangiocarcinoma. As formas comuns de transmissão do HCV incluem a transfusão de sangue, utilização de drogas intravenosas, procedimentos de colocação de piercings ou tatuagens, exposição nosocomial, contacto sexual, contacto doméstico casual, durante as técnicas de reprodução assistida e de mãe para filho durante a gravidez, parto ou período pós-parto. Os níveis de anti-HCV podem permanecer positivos durante grandes períodos de tempo (anos) o que significa que um teste positivo indica infeção recente ou indivíduo portador, não indicando infecciosidade ou imunidade. Só o teste da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*) que deteta o RNA do vírus deve ser usado para confirmar infeção aguda por HCV. Um teste negativo para os anticorpos anti-HCV não exclui a possibilidade da infeção pois pode não haver seroconversão (1).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA e heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** HCV é um imunoensaio do tipo sanduíche com duplo antigénio. A amostra é incubada com fase sólida contendo os antigénios recombinantes e de peptídeo de HCV

sintético. O complexo antígeno-anticorpo formar-se-á caso o anticorpo anti-HCV esteja presente na amostra. É utilizado reagente fluorescente contendo IgG anti-humano monoclonal marcado com éster de acridínio para detetar o IgG anti-HCV na amostra. Existe uma relação direta entre o nível de anticorpos anti-HCV encontrados na amostra do doente e a quantidade de unidades de luz relativa (ULRs) detetada pelo sistema. É determinado um resultado reativo, não reativo ou equívoco de acordo com o valor indicador estabelecido com os calibradores.

### **13.4. Imunoalergologia**

#### **13.4.1. Imunoglobulina E (IgE)**

**Nota:** A IgE é uma imunoglobulina produzida principalmente nas mucosas respiratória e intestinal, e constitui parte do sistema de anticorpos secretores externos. As moléculas de IgE ligam-se à superfície dos mastócitos e basófilos. A subsequente ligação dos alérgenos às IgE complexadas com as células, induz a libertação por estas de histaminas e outras substâncias vasoativas, iniciando desse modo os quadros conhecidos por reação alérgica. O doseamento dos níveis de IgE total é útil para estabelecer a presença de doenças alérgicas e para definir a especificidade do alérgeno das reações de hipersensibilidade imediata. São exemplos a asma, rinite alérgica, dermatite, anafilaxia e urticária (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Immulite 2000

**Método:** IgE Total é doseado por um método imunométrico em fase sólida quimioluminescente.

#### **13.4.2. AlaTOP (Rastreio de Alergias)**

**Nota:** Está demonstrado que existe um grande número de substâncias com potencial alérgico. As dosagens de imunoglobulinas específicas, IgE, são úteis para estabelecer a presença de doenças alérgicas e para definir a especificidade do alérgeno das reações de sensibilidade imediata. Nos doentes com asma extrínseca, febre dos fenos ou eczema atópico, os sintomas podem aparecer imediatamente após o contacto com o alérgeno. Uma resposta alérgica deste tipo (atópica ou anafilática) é normalmente

função de IgE. As moléculas de IgE atuam como pontos de contacto entre o alergénio. Este processo desencadeia o que denominamos de reação alérgica. Os testes de IgE específica associados a outros dados clínicos permitem identificar os alergénios para os quais o doente está sensibilizado (1). AlaTOP é um painel de inalantes existentes em fase líquida. Esta tecnologia representa um avanço significativo face a outros métodos convencionais, onde os alergénios estão ligados a um suporte de fase sólida, como um disco de papel.

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Immulite 2000

**Método:** AlaTOP é um método imunológico quimioluminescente que utiliza alergénios líquidos marcados, anticorpos monoclonais e uma fase sólida revestida com anti-ligante. Os alergénios ligam-se covalentemente à matriz polimérica/copolimérica solúvel, que por sua vez está marcada com um ligando. De forma a capturar os alergénios, as esferas de poliestireno estão revestidas com um ligando.

## 14. Endocrinologia

### 14.1. Hormonas Sexuais e Gonadotrofinas

#### 14.1.1. Hormona Folículo Estimulante (FSH)

**Nota:** A FSH é segregada pela hipófise anterior em resposta à hormona libertadora de gonadotropina (GnRH) segregada pelo hipotálamo. Tanto em homens como em mulheres, a secreção de FSH é regulada por um equilíbrio de mecanismos de *feedback* positivo e negativo que envolvem o eixo hipófise-hipotálamo, os órgãos reprodutivos e as hormonas hipofisárias e esteróides sexuais. A FSH atua sobre as células granulosas do ovário e sobre as células de Sertoli no testículo. Normalmente, aumentos de FSH ocorrem nos estados iniciais da puberdade, 2 a 4 anos antes da hormona luteinizante (LH) atingir níveis comparáveis. Elevados níveis de FSH estão associados à menopausa e à hipofunção primária dos ovários nas mulheres e ao hipogonadismo primário nos homens. Os níveis reduzidos de FSH estão associados à hiperfunção primária dos ovários, doença policística dos ovários nas mulheres e ao hipergonadismo primário nos homens. A avaliação desta hormona apoia outros

estudos relacionados com causas determinantes de hipotireoidismo nas mulheres e disfunção endócrina nos homens (3).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** A detecção da hormona FSH é realizada por um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos que têm especificidade em relação à molécula de FSH intacta. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo policlonal anti-FSH de ovelha marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal anti-FSH de rato que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas. Existe uma relação direta entre a quantidade de FSH presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### 14.1.2. Hormona Luteinizante (LH)

**Nota:** A hormona luteinizante (LH) é uma hormona glicoproteica com duas subunidades. A subunidade alfa é semelhante às da hormona foliculoestimulante (FSH), da gonadotrofina coriónica humana (hCG) e da hormona estimulante da tiróide (TSH). A subunidade beta é diferente das de outras hormonas glicoproteicas e confere a sua especificidade bioquímica. A LH é segregada pela hipófise anterior em resposta à hormona libertadora de gonadotropina (GnRH) segregada pelo hipotálamo. Tanto em homens como em mulheres, a secreção da LH é regulada por um equilíbrio de mecanismos de resposta positiva e negativa que envolvem o eixo hipotálamo-hipófise, os órgãos reprodutivos e as hormonas hipofisárias e esteróides sexuais. A LH e a outra gonadotropina hipofisária, a FSH, desempenham um papel crítico na manutenção do normal funcionamento dos sistemas reprodutores masculino e feminino. Nos homens, a FSH e LH são necessárias para o desenvolvimento e maturação dos espermatozoides. Nas mulheres, a formação folicular é estimulada pela FSH, depois o pico de LH no meio do ciclo causa ovulação dos folículos ovarianos. Os testes conjuntos de FSH e LH podem ajudar a determinar se uma deficiência gonadal tem origem primária ou é causada por estimulação insuficiente das hormonas hipofisárias. A determinação conjunta destas duas hormonas é também útil no estudo de crianças com problemas endócrinos relacionadas com a puberdade precoce (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** A detecção da hormona LH é realizada por um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos que têm especificidade em relação à subunidade beta da molécula de LH intacta. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo monoclonal anti- LH de rato marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal anti-LH de rato que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas. Existe uma relação direta entre a quantidade de LH presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### **14.1.3. Estradiol (E2)**

**Nota:** A medição dos níveis de estradiol em circulação é importante para avaliar o funcionamento dos ovários e monitorizar o desenvolvimento folicular em protocolos de reprodução assistida. Nas mulheres normais que não estejam grávidas, o estradiol é segregado sobretudo pelo funcionamento combinado das células da teca e da granulosa do folículo em desenvolvimento e do corpo lúteo. Durante a gravidez, a placenta é uma fonte de secreção do estradiol. O estradiol entra no fluxo sanguíneo onde 1 a 3% não está ligado a proteína, 40% está ligado à globulina de ligação às hormonas sexuais (SHBG) e o restante está ligado a albumina. A principal função do estradiol é estimular o crescimento dos órgãos sexuais femininos e o desenvolvimento de características sexuais secundárias. O nível elevado de estradiol está implicado na regressão do corpo lúteo. A menos que o óvulo seja fertilizado, o nível de estradiol diminui, assinalando o início de um novo ciclo. Os níveis elevados de estradiol nas mulheres podem também resultar de hiperfunção primária ou secundária dos ovários. Níveis muito elevados de estradiol são detetados durante a indução da ovulação na terapia de reprodução assistida ou durante a gravidez. Níveis reduzidos de estradiol nas mulheres podem resultar tanto da falta de síntese nos ovários (hipofunção primária dos ovários e menopausa) como de uma lesão no eixo hipotálamo-hipófise (hipofunção secundária dos ovários). Os níveis de estradiol são normalmente baixos nos homens. Níveis elevados de estradiol nos homens podem ser devidos à acrescida aromatização dos androgénios, resultando em ginecomastia (2).

**Amostra:** Soro e plasma (EDTA e heparina de lítio)

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** eE2 é um método quimioluminescente que utiliza um formato de ensaio competitivo. O estradiol endógeno contido numa amostra é libertado das suas proteínas de ligação por um agente libertador. Depois, um anticorpo monoclonal anti-estradiol marcado com éster de acridina é adicionado para ligar o estradiol disponível. Por fim, uma fase sólida de captação do derivado de estradiol é adicionada à reação para competir com o estradiol pela ligação do anticorpo marcado com acridina. Após a lavagem, os reagentes ácido e de base são distribuídos para iniciar a reação quimioluminescente. Existe uma relação inversa entre a quantidade de estradiol presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### 14.1.4. Progesterona

**Nota:** A progesterona, em conjunto com os estrogénios, regula as funções do trato reprodutivo durante o ciclo menstrual. A progesterona é crítica na preparação do endométrio para a implantação do blastocisto e na manutenção da gravidez. As principais fontes da progesterona nas mulheres são o corpo lúteo e a placenta. A avaliação clínica da progesterona confirma a ovulação e a função lútea normal nas mulheres não grávidas. Uma produção inadequada de progesterona pelo corpo lúteo pode indicar deficiência da fase lútea (LPD), a qual está associada à infertilidade e aos abortos precoces. As mulheres que utilizam contraceptivos orais têm níveis de progesterona suprimidos (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** A Progesterona é detetada por um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescente direta. A progesterona na amostra do doente liga-se a um anticorpo monoclonal anti-progesterona de rato marcado com éster de acridina no Reagente Lite. O anticorpo não ligado liga-se a um derivado da progesterona, ligado por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida. Existe uma relação inversa entre a quantidade de progesterona presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### 14.1.5. Prolactina (PRL)

**Nota:** A prolactina é uma hormona polipeptídica de cadeia única segregada pela hipófise anterior, sob o controlo de fatores inibidores e libertadores da prolactina. Estes fatores são segregados pelo hipotálamo. A prolactina também é sintetizada pela placenta e está presente no fluido amniótico. Esta hormona inicia e mantém a lactação nas mulheres, desempenhando também um papel na regulação da função das gónadas tanto em homens como em mulheres. O exercício físico, o *stress* e o sono também provocam aumentos momentâneos nos níveis da prolactina. Este teste é útil no diagnóstico, tratamento e acompanhamento de tumores secretores de prolactina, hiperprolactinemia e infertilidade (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** A Prolactina é detetada por um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo policlonal antiprolactina de cabra marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal anti-prolactina de rato que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas. Existe uma relação direta entre a quantidade de prolactina presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### 14.1.6. Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG)

**Nota:** A gonadotropina coriónica humana (hCG) é uma glicoproteína com duas subunidades não ligadas por covalência, a subunidade alfa e a subunidade beta. A hCG é sintetizada pelas células da placenta e está implicada na manutenção do corpo lúteo durante a gravidez. Deteta-se logo na primeira semana após a conceção. Na gravidez, os níveis de hCG aumentam exponencialmente durante 8 a 10 semanas após o último ciclo menstrual. Mais tarde, durante a gravidez, cerca de 12 semanas após a conceção, a concentração de hCG começa a baixar à medida que a placenta começa a produzir hormonas esteróides. Outras fontes de valores elevados de hCG são a gravidez ectópica, a ameaça de aborto e o fim recente de uma gravidez sendo o teste mais específico e sensível para essa deteção. É um teste útil na avaliação e tratamento de tumores testiculares (1).



**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** hCG Total (ThCG) é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo policlonal anti-hCG de cabra que foi purificado por afinidade e marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal anti-hCG de rato purificado que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas. Estes dois anticorpos são específicos para diferentes epítomos que estão presentes tanto na subunidade  $\beta$  livre como na subunidade  $\beta$  da hCG intacta. Existe uma relação direta entre a quantidade de hCG presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

## **14.2. Função Tiroideia**

### **14.2.1. Hormona Tireoestimulante (TSH)**

**Nota:** A hormona estimulante da tiróide (TSH) é sintetizada e segregada pela hipófise anterior em resposta a um mecanismo de resposta negativa que envolve concentrações de  $FT_3$  ( $T_3$  livre) e de  $FT_4$  ( $T_4$  livre). Além disso, o tripéptido hipotalâmico, a hormona libertadora de tirotropina (TRH), estimula diretamente a produção de TSH. A TSH interage com recetores de célula específicos na superfície da célula da tiróide e exerce duas ações principais. A primeira ação é estimular a reprodução de células e a hipertrofia. Em segundo lugar, a TSH estimula a glândula tiróide a sintetizar e segregar  $T_3$  e  $T_4$ . A capacidade para quantificar os níveis de TSH em circulação é importante na avaliação do funcionamento da tiróide. É especialmente útil no diagnóstico diferencial entre o hipotireoidismo primário (tiróide), o secundário (hipófise) e o terciário (hipotálamo). Os ensaios de TSH com sensibilidade e especificidade acrescidas proporcionam uma ferramenta de diagnóstico primário para diferenciar os doentes com hipertiróide dos que sofrem de eutiróide (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** TSH-3 é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes

de dois anticorpos. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo monoclonal anti-TSH de rato marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo policlonal anti-TSH de ovelha que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas. Existe uma relação direta entre a quantidade de TSH presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### **14.2.2. Tiroxina Total ( $T_4$ )**

**Nota:** A tiroxina (3,5,3',5'-L-tetraiodotironina,  $T_4$ ) é uma hormona sintetizada e segregada pela glândula tiróide e desempenha um papel importante na regulação do metabolismo. A  $T_4$  é segregada para a circulação como resposta à hormona TSH (hormona estimulante da tiróide). A secreção da  $T_4$  é regulada por um mecanismo de resposta negativa que envolve a glândula tiróide, o hipotálamo e a hipófise. Na circulação, 99,95% da  $T_4$  está reversivelmente ligada a proteínas de transporte, sobretudo à globulina de ligação à tiroxina (TBG) e, em menor grau, à albumina e à pré-albumina. A  $T_4$  livre ou não ligada é metabolicamente ativa e a  $T_4$  ligada é metabolicamente inativa, agindo como reserva. Nos indivíduos saudáveis, as concentrações de TBG mantêm-se razoavelmente constantes. Contudo, sabe-se que a gravidez, o excesso de estrogénios, androgénios, esteróides anabólicos e glucocorticóides alteram os níveis de TBG e podem ocasionar valores falsos da tiróide nos testes ao funcionamento da tiróide. Os níveis alterados de  $T_4$  nestas situações podem não refletir com exatidão o estado da tiróide. A disfunção primária da glândula tiróide pode resultar em libertação excessiva (hiper) ou inferior ao normal (hipo) de  $T_4$  ou  $T_3$ . Além disso, dado que o funcionamento da tiróide é diretamente afetado pela TSH, a disfunção da hipófise ou do hipotálamo influencia a atividade da glândula tiróide. A doença em qualquer parte do sistema tiróide-hipófise-hipotálamo pode influenciar os níveis de  $T_4$  e  $T_3$  no sangue (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** A deteção de  $T_4$  é executada por um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescente direta. A  $T_4$  na amostra do doente compete com a  $T_4$ , que está ligada por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida, por uma quantidade limitada de anticorpo monoclonal anti- $T_4$  de rato marcado com éster de acridina no Reagente Lite. Existe uma relação inversa entre a quantidade de  $T_4$

presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### 14.2.3. Tiroxina Livre (FT<sub>4</sub>)

**Nota:** A tiroxina livre (FT<sub>4</sub>) constitui uma pequena fração da tiroxina total. A FT<sub>4</sub> não está ligada a proteínas e encontra-se disponível para os tecidos sendo metabolicamente ativa e um precursor da triiodotironina (T<sub>3</sub>). Esta fração constitui cerca de 5% do T<sub>4</sub> circulante. Os níveis de T<sub>4</sub> livre estão correlacionados com a secreção e o metabolismo de T<sub>4</sub>. No hipotireoidismo e no hipertireoidismo, os níveis de FT<sub>4</sub> são paralelos às alterações nos níveis da T<sub>4</sub> total. Medir a T<sub>4</sub> livre é útil quando ocorrem níveis alterados de T<sub>4</sub> total devido a alterações nas proteínas de ligação à T<sub>4</sub>, sobretudo na globulina de ligação à tiroxina (TBG) (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** FT<sub>4</sub> é detetada por um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescente direta. A FT<sub>4</sub> na amostra do doente compete com a T<sub>4</sub> marcada com éster de acridina no Reagente Lite por uma quantidade limitada de anticorpo policlonal anti-T<sub>4</sub> biotinilado de coelho. A anti-T<sub>4</sub> marcada com biotina está ligada à avidina, que está ligada por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida. Existe uma relação inversa entre a quantidade de FT<sub>4</sub> presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### 14.2.4. Triiodotironina Total (T<sub>3</sub>)

**Nota:** A triiodotironina (3,5,3'-L-triiodotironina, T<sub>3</sub>) é uma hormona que tem a sua origem na síntese e na secreção direta da tiróide (aproximadamente 20%) e na conversão periférica de T<sub>4</sub> em T<sub>3</sub> (aproximadamente 80%). A T<sub>3</sub> é segregada para a circulação como resposta à hormona TSH. A secreção de T<sub>3</sub> é regulada por um mecanismo de resposta negativa que envolve a glândula tiróide, a hipófise e o hipotálamo. Embora os níveis da T<sub>3</sub> no soro sejam pequenos, ela tem uma maior potência fisiológica do que a T<sub>4</sub>. Na circulação, 99,7% da T<sub>3</sub> está reversivelmente ligada a proteínas de transporte, sobretudo à globulina de ligação à tiroxina (TBG) e, em menor grau, à albumina e à pré-albumina de ligação à tiroxina (TBPA). A T<sub>3</sub> livre

ou não ligada é metabolicamente ativa e a  $T_3$  ligada é metabolicamente inativa, agindo como reserva para a  $T_3$  livre. Nos indivíduos saudáveis, as concentrações de TBG mantêm-se relativamente constantes. Contudo, sabe-se que a gravidez, o excesso de estrogénios, andrógenos, esteróides anabólicos e glucocorticóides alteram os níveis de TBG e podem ocasionar valores falsos da tiróide nos testes ao funcionamento da tiróide. Os níveis de  $T_3$  nestas situações podem não refletir com exatidão o estado da tiróide. A disfunção primária da glândula tiróide pode resultar em libertação excessiva (hiper) ou inferior ao normal (hipo) de  $T_3$  ou  $T_4$ . Além disso, dado que o funcionamento da tiróide é diretamente afetado pela TSH, a disfunção da pituitária ou do hipotálamo influencia a atividade da glândula tiróide. A doença em qualquer parte do sistema tiróide-hipófise-hipotálamo pode influenciar os níveis de  $T_3$  e  $T_4$  no sangue. Em termos de diagnóstico, a concentração de  $T_3$  é mais sensível a certas condições da tiróide do que a  $T_4$ . Enquanto os níveis de  $T_4$  constituem um indicador sensível (e superior) de hipotiroidismo, os níveis de  $T_3$  no sangue definem melhor o hipertiroidismo. Dado que a concentração de  $T_3$  no soro muda mais rápida e acentuadamente do que a de  $T_4$ , o nível de  $T_3$  também é um excelente indicador da capacidade da tiróide para responder a testes estimulantes e supressivos. Em condições de forte estimulação da tiróide, o nível de  $T_3$  também proporciona uma boa estimativa da reserva tiróideia (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:**  $T_3$  é detetada por um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescente direta. A  $T_3$  na amostra do doente compete com a  $T_3$  análoga, que está ligada por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida, por uma quantidade limitada de anticorpo monoclonal anti- $T_3$  de rato marcado com éster de acridina no Reagente Lite. Existe uma relação inversa entre a quantidade de  $T_3$  presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### 14.2.5. Triiodotironina Livre ( $FT_3$ )

**Nota:** A triiodotironina livre é uma determinação usada para avaliar a função da tiróide. Os níveis de  $T_3$  livre estão correlacionados com a secreção e o metabolismo de  $T_3$ . É um teste usado para excluir toxicose por  $T_3$ , para avaliar a terapia de reposição tiroídiana e para esclarecer anormalidades de ligação às proteínas (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** FT<sub>3</sub> é doseado por um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescente direta. A FT<sub>3</sub> na amostra compete com uma T<sub>3</sub> análoga, que está ligada por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida, por uma quantidade limitada de uma combinação de anticorpos monoclonais anti-T<sub>3</sub> de rato marcados com éster de acridina no Reagente Lite. Existe uma relação inversa entre a quantidade de FT<sub>3</sub> presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### 14.2.6. Tiroglobulina

**Nota:** A tiroglobulina é uma glicoproteína normalmente sintetizada nas células foliculares da tiróide, sob a influência da tirotropina (TSH), e representa o precursor da tiroxina e outras iodotironinas. As principais aplicações clínicas para a medição desta pró-hormona derivam do facto de que o tecido da tiróide operante parece ser a única fonte de tiroglobulina circulante. Da mesma forma, as determinações de tiroglobulina têm sido amplamente utilizadas para complementar outros meios de diagnóstico, como auxílio na identificação da presença ou ausência de tecido de tiróide operante, ou no aumento de tal tecido em relação a valores base de referência estabelecidos individualmente. Este teste é útil no diagnóstico diferencial do hipertiroidismo e na monitorização da evolução do cancro da tiróide. Não é utilizado para diagnosticar cancro da tiróide e valores ligeiramente elevados são encontrados em recém-nascidos e durante o terceiro trimestre de gestação (1).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Immulite 2000

**Método:** Ensaio imunométrico em fase sólida quimioluminescente.

### **14.3. Marcadores Tumorais**

#### **14.3.1. Antigénio Específico da Próstata (PSA Total)**

**Nota:** O antigénio específico da próstata (PSA) é uma glicoproteína de cadeia única normalmente encontrada no citoplasma das células epiteliais, revestindo os ácinos e os canais da glândula da próstata. É detetado no soro de homens com tecido da próstata normal, hipertrófico benigno e maligno, não sendo detetado no soro de homens que não tenham tecido da próstata (devido a prostatectomia radical ou citoprostatectomia) nem no soro da maioria das mulheres. O facto de o PSA ser exclusivo do tecido da próstata torna-o um marcador apropriado para a monitorização de homens com cancro da próstata. Também é útil para determinar uma possível recaída após o tratamento quando utilizado em conjunto com outros índices de diagnóstico. A medição dos níveis de PSA no soro não é recomendada como procedimento de rastreio para o diagnóstico de carcinoma já que níveis elevados também se verificam em doentes com hipertrofia prostática benigna. Os níveis de PSA aumentam nos homens com carcinoma da próstata e, após uma prostatectomia radical, os níveis de PSA descem normalmente até aos valores não detetáveis. Se o tecido prostático ficar após a cirurgia ou ocorrer metástase, o PSA parece ser útil na deteção de uma recaída residual e precoce do tumor. Portanto, os seus níveis em série podem ajudar a determinar o sucesso da prostatectomia e a necessidade de tratamento adicional, como por exemplo, radiação, terapia endócrina ou quimioterapia, e na monitorização da eficácia do tratamento (2).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** PSA é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo policlonal anti-PSA de cabra marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal anti-PSA de rato que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas. Existe uma relação direta entre a quantidade de PSA presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

### 14.3.2. Antígeno Específico da Próstata (PSA Livre)

**Nota:** A atividade proteolítica do PSA é inibida na corrente sanguínea pela formação de complexos com inibidores da protease serina. As formas imunorreativas principais de soro PSA incluem PSA livre e complexos de PSA, sobretudo com um  $\alpha$ -1-antiquimotripsina (ACT), e pequenas quantidades de inibidor da  $\alpha$ -2-antitripsina e inter- $\alpha$ -tripsina. A maior parte do PSA livre no soro parece ser uma forma ativa que não se pode conjugar com inibidores da protease, e pode ser um zimógeno PSA ou uma forma combinada de PSA enzimaticamente inativa. O PSA também forma complexos com a  $\alpha$ -2-macroglobulina. No entanto, esta forma não é imunorreativa devido à sua encapsulação pela molécula  $\alpha$ -2-macroglobulina. Foram concebidos ensaios imunométricos para medir seletivamente o PSA livre, o PSA conjugado com ACT (cPSA), e PSA total (PSA livre mais cPSA). Verificou-se que a proporção de PSA livre no soro é significativamente maior nos homens com hiperplasia benigna da próstata (HBP) que nos homens com cancro da próstata. A percentagem de PSA livre determinada através da comparação da concentração de PSA livre com a concentração de PSA total medidas no mesmo instrumento foi proposta como forma de melhorar a discriminação entre a HBP e o carcinoma da próstata em homens com níveis de PSA total entre 4–10 ng/ml (4, 5).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** fPSA é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza dois anticorpos de ratinho monoclonal. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo anti-PSA marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo anti-PSA-livre marcado com biotina e ligado a partículas paramagnéticas de estreptavidina. Existe uma relação direta entre a quantidade de fPSA presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

### 14.3.3. Antígeno carbohidratado 125 (CA 125)

**Nota:** O CA 125 é identificado como uma glicoproteína semelhante à mucina de 200 a 1000 kDa. O CA 125 é um antígeno de superfície associado ao cancro do ovário epitelial não mucinoso. A proteína é rejeitada ou segregada a partir da superfície das

células do cancro do ovário para o soro ou ascite. O antígeno reage a um anticorpo monoclonal murino, o OC 125, que foi originalmente desenvolvido por ratos em fase de imunização com células da linha de células do cancro do ovário OVCA 433. Os ensaios de segunda geração para o CA 125 utilizam tanto o epítopo OC 125 como o M11, resultando num melhor intervalo de ensaio. O CA 125 é um marcador tumoral útil para avaliar a terapia e monitorizar o estado da doença em doentes sujeitas a tratamento do cancro do ovário. Na fase pós-operatória, o nível de CA 125 correlaciona-se com o volume do tumor e constitui um indicador prognóstico do resultado clínico. Tem-se constatado que as doentes com níveis superiores a 35 U/ml têm o risco mais elevado para a recorrência clínica. Quando medidos em série, os níveis de CA 125 têm uma correspondência com a progressão ou regressão da doença. A taxa de variação no CA 125 é também altamente prognóstica. Uma rápida redução no nível de CA 125 indica uma resposta positiva ao tratamento. Como ferramenta de diagnóstico, o nível de CA 125 só por si não é suficiente para determinar a presença ou a extensão da doença. Nas mulheres em período pós-menopausa, porém, o nível de CA 125 em combinação com a ultra-sonografia poderá permitir distinguir as massas pélvicas benignas das malignas. As doentes com determinadas condições benignas, como cirrose hepática, pancreatite aguda, endometriose, doença pélvica inflamatória, menstruação e gravidez do primeiro trimestre, têm apresentado níveis elevados de CA 125. Observam-se níveis elevados em 1 a 2% de dadoras saudáveis. O CA 125 também pode ser encontrado em doenças malignas não ginecológicas que envolvem os pulmões ou o trato gastrointestinal (3).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** CA 125 II é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta e que utiliza dois anticorpos monoclonais de rato específicos para o CA 125. O primeiro anticorpo visa o domínio antigénico do M11 e está marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo visa o domínio antigénico do OC 125 e está marcado com fluoresceína. O imunocomplexo formado com o CA 125 é capturado pelo anticorpo anti-fluoresceína monoclonal de rato ligado a partículas paramagnéticas na Fase Sólida. Existe uma relação direta entre a quantidade de CA 125 presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.



#### 14.3.4. Antigénio carbohidratado 19-9 (CA 19-9)

**Nota:** O CA 19-9 é um antigénio associado a um tumor que é reativo com um anticorpo que foi produzido em resposta à imunização com uma linha de células de um carcinoma coloretal humano. Embora o anticorpo tenha sido derivado de uma linha de cancro do cólon, os estudos têm concluído que os ensaios para o CA 19-9 são mais úteis para diagnosticar e tratar doentes com neoplasia pancreática do que com neoplasia do cólon. Não é um teste recomendado na monitorização de cancro do cólon. O CA 19-9 também demonstrou ser um marcador mais sensível e específico do cancro pancreático do que outros marcadores serológicos, sendo útil para diferenciar cancro pancreático de pancreatite. Encontra-se muito pouco deste antigénio no sangue de doentes normais ou dos que têm doenças benignas, mas a maioria dos doentes com cancro pancreático tem níveis elevados de CA 19-9. Embora os níveis elevados de CA 19-9 não sejam especificamente característicos do cancro pancreático, é atualmente o teste sanguíneo mais útil para diferenciar doenças pancreáticas benignas e malignas. Este marcador encontra-se elevado na doença inflamatória intestinal, cirrose e nas doenças reumáticas. Consegue-se uma maior sensibilidade de diagnóstico quando se combina um ensaio para o CA 19-9 com o exame imagiológico, como a ultra-sonografia ou a tomografia computadorizada (TAC). Esta combinação é útil para determinar um diagnóstico em doentes com suspeita de terem cancro pancreático (3).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** CA 19-9 é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em duas etapas que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta e que utiliza um único anticorpo monoclonal, o 1116-NS-19-9, tanto para a Fase Sólida como para o Reagente Lite. O anticorpo é ligado por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida e o mesmo clone de anticorpo é marcado com éster de acridina no Reagente Lite. A amostra e a Fase Sólida ficam a incubar a uma temperatura de 37 °C durante 7,5 minutos, seguindo-se uma etapa de lavagem para remover o excesso de antigénios não ligados. O Reagente Lite reage então com os antigénios CA 19-9 ligados na Fase Sólida durante uma incubação adicional de 20 minutos. Por isso, o efeito de gancho de dose elevada é eliminado neste ensaio. Existe uma relação direta entre a concentração de CA 19-9 presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### 14.3.5. Antígeno carbohidratado 15-3 (CA 15-3)

**Nota:** CA 15-3 é uma glicoproteína altamente polimórfica, pertencente à família das mucinas, e é produto do gene MUC-1. Este antígeno é quantificado através da utilização de dois anticorpos monoclonais (115D8 e DF3), o anticorpo monoclonal 115D8 é dirigido contra um antígeno presente nas membranas dos glóbulos de gordura do leite humano, enquanto que o anticorpo DF3 é dirigido contra um antígeno do carcinoma mamário humano. Esta dupla reatividade confere um grau adicional de especificidade e está geralmente associado ao cancro da mama metastático, no entanto, este marcador pode ser encontrado em pacientes com cancro do pulmão ou doença não maligna. Embora possua várias vantagens, CA 15-3 não é suficientemente sensível para detetar o cancro da mama numa fase inicial, assim a *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) recomenda este marcador para a monitorização da resposta da doença metastática apenas quando não há outro tipo de determinação da evolução da doença (3).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** CA 15-3 é detetado por um imunoensaio totalmente automatizado do tipo sanduíche, efetuado em duas etapas, que recorre à tecnologia quimioluminescente direta. O Reagente Lite é composto por um anticorpo monoclonal de rato, o DF3, específico para o CA 15-3, marcado com éster de acridina. O Reagente Conjugado é composto por um anticorpo monoclonal de rato, o 115D8, específico para o CA 15-3, marcado com fluoresceína. A Fase Sólida é composta pelo anticorpo monoclonal de captura de rato purificado, que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas. A amostra fica a incubar com Reagente Conjugado e Fase Sólida simultaneamente durante 20 minutos. Após a incubação, o imunocomplexo é lavado e o Reagente Lite é adicionado, fica a incubar durante outros 20 minutos e depois é novamente lavado. Este protocolo de duas etapas elimina o efeito de gancho de dose elevada neste ensaio. Existe uma relação direta entre a quantidade de CA 15-3 presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### 14.3.6. Antígeno Carcino-Embrionário (CEA)

**Nota:** *Carcinoembryonic Antigen* (CEA) é uma glicoproteína encontrada abundantemente no epitélio entodérmico embrionário e também um antígeno

oncofetal, ou seja, está presente na vida fetal, mas ausente ou em concentrações muito reduzidas nos indivíduos adultos, a menos que seja sintetizado por uma proliferação anormal de células. Níveis aumentados de CEA no soro foram detetados em pessoas com cancro colorectal primário e em doentes com outras patologias malignas, incluindo os cancros do trato gastrointestinal, mama, pulmão, ovários, próstata, fígado e pâncreas. Níveis elevados de CEA no soro foram também detetados em doentes com doenças não malignas, sobretudo em doentes de idade mais avançada ou fumadores. Os níveis de CEA não são úteis na despistagem de cancros não detetados na população em geral. Contudo, os seus níveis proporcionam dados importantes acerca do prognóstico do doente, da recorrência de tumores após remoção cirúrgica e da eficácia da terapia. Os níveis de CEA em série são úteis na monitorização da evolução da doença. Estes caem usualmente para níveis normais ou próximos do normal 1 a 4 meses após a remoção cirúrgica do tecido canceroso. Uma subida nos níveis de CEA pode ser o primeiro indicador de recorrência e pode preceder sinais e sintomas físicos. Os níveis de CEA em série também são úteis na avaliação da eficácia da quimioterapia ou do tratamento por radiação. Um aumento sustentado dos níveis de CEA pode indicar uma terapia ineficaz ou a possibilidade de metástase. O CEA é uma ferramenta útil na monitorização e no tratamento da terapia do cancro e proporciona aos médicos dados adicionais acerca do prognóstico do doente (3).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** O CEA é detetado por um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo policlonal purificado anti-CEA de coelho marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal anti-CEA de rato ligado por covalência a partículas paramagnéticas. Existe uma relação direta entre a quantidade de CEA presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

#### **14.3.7. Alfa Feto Proteína (AFP)**

**Nota:** A  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) é a principal proteína sérica presente no feto (semelhante à albumina no adulto). A AFP e a albumina partilham uma homologia

sequencial considerável e algumas funções fisiológicas. A síntese da AFP fetal ocorre no fígado, no saco vitelino e no trato gastrointestinal. A AFP fetal é segregada para o soro fetal, atinge um pico por volta da 14ª semana de gestação e depois declina gradualmente durante a gestação. Pouco tempo após o nascimento, o nível de AFP do recém-nascido atinge o nível normal do adulto. Nos adultos, vários estudos demonstraram a existência de elevados níveis de AFP sérica no cancro hepatocelular, tumores malignos da célula germinal nos ovários e testículos e teratocarcinoma dos testículos. Embora com uma taxa de incidência muito baixa, concentrações acrescidas de AFP circulante também podem ocorrer em amostras de soro de doentes com cancro gastrointestinal, pancreático e pulmonar. Níveis elevados de AFP no soro estão intimamente associados ao cancro testicular e é um teste amplamente utilizado no diagnóstico do cancro hepatocelular, no entanto, a medição da AFP no soro, em conjunto com a hCG sérica, é um regime estabelecido para a monitorização de doentes com carcinoma testicular. Certas hepatopatias não malignas (cirrose, hepatite, necrose) podem conduzir a um aumento de AFP, bem as metástases no fígado, originárias de outras patologias malignas. Assim, os resultados dos exames devem ser considerados juntamente com outras informações clínicas (3).

**Amostra:** Soro

**Equipamento:** Centaur XP

**Método:** AFP é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo policlonal de afinidade purificado anti-AFP de coelho marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal anti-AFP de rato ligado por covalência a partículas paramagnéticas. Existe uma relação direta entre a quantidade de AFP presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detetadas pelo sistema.

## **Microbiologia**

Os microrganismos infecciosos para o Homem estão presentes em todo o tipo de ambientes e o seu reservatório mais importante é talvez o próprio Homem. Estes microorganismos estabeleceram ao longo de milhares de anos de evolução uma relação de mutualismo e simbiose com o hospedeiro, no entanto, certas circunstâncias podem quebrar essa ligação e alterar o comportamento do microrganismo face ao hospedeiro, originando uma **infecção**. Com muita frequência, a suspeita clínica de infecção é primariamente levantada quando o paciente apresenta queixas ou sintomas como febre, calafrios, cefaleias ou mialgia. Após o exame físico ao paciente é realizada a próxima fase deste processo – a investigação laboratorial. A Microbiologia Clínica é uma valência importante nos laboratórios de análises clínicas uma vez que os seus exames laboratoriais fornecem várias evidências como a confirmação de infecção, identificação da causa do processo infeccioso e por vezes indica uma forma de terapêutica a seguir (3).

Ao iniciar funções nesta área, passou pelas fases pré-analítica (colaboração na reorganização geral do laboratório na área de Microbiologia, contribuindo para a uniformização de técnicas de colheita de produtos biológicos, de procedimentos de sementeira, implementação de testes presuntivos e de identificação definitiva, bem como execução de colheitas especiais de Bacteriologia), analítica (acompanhamento e manutenção de técnicas microbiológicas, execução e validação analítica das análises microbiológicas efetuadas no laboratório) e pós-analítica (acompanhou, com a sua orientadora, a validação biopatológica, colaborando no estudo de situações analíticas, no contacto com os clínicos para o esclarecimento de situações relacionadas com os utentes e realização e acompanhamento da avaliação externa da qualidade). Assim, depois de gradualmente se ter integrado na rotina diária, passou pelas secções de bacteriologia, parasitologia e micologia, realizando as respetivas técnicas e procedimentos efetuados no laboratório.

### **15. Controlo de Qualidade em Microbiologia**

O Programa de Avaliação Externa da Qualidade permite ao Hemobiolab avaliar o seu desempenho, em termos de exatidão, através da análise de amostras bacterianas enviadas para identificação e realização de antibiograma, fezes e esfregaços sanguíneos para identificação e quantificação de parasitas.

O Programa de Controlo de Qualidade Interno no laboratório Hemobiolab utiliza, na área da Microbiologia, 3 estirpes de referência liofilizadas ATCC (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Para tal, mensalmente, são semeados os meios de cultura apropriados e efetuados a identificação e antibiograma respetivos, tanto pelo método de rotina como pelo método automatizado. Se a identificação/antibiograma não estiver de acordo com o definido na bula/equipamento, o controlo deverá ser repetido. Se a nova série de controlo continuar a não obedecer às regras anteriores, contacta-se a Assistência Técnica.

Para além disso, no Hemobiolab efetua-se controlo de esterilidade de todos os lotes de meios de cultura e da solução salina estéril para preparação do inóculo utilizado pelo sistema automatizado. São também controladas as temperaturas de todas as estufas e refrigeradores.

## 16. Equipamentos

- **Vitek 2 Compact** (Fig. 17)



Figura 17 - Vitek 2 Compact

Este aparelho baseia-se num sistema destinado à identificação de bactérias e fungos e realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos de bactérias com relevância clínica.

**Amostras utilizadas:** Isolados bacterianos e fúngicos.

**Fundamento do método:** Para identificação, são utilizadas cartas específicas com 64 poços que contêm diferentes substratos (Fig. 18). A suspensão de microrganismos, previamente preparada em solução salina estéril com uma turvação (escala de McFarland) ajustada ao tipo de microrganismo em estudo, é inoculada pelo aparelho nas cartas. A interação com os diferentes substratos permite avaliar diferentes atividades metabólicas, tais como acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática e crescimento na presença de substâncias inibidoras. A incubação das cartas realiza-se a  $35,5 \pm 1,0^\circ\text{C}$ .



**Figura 7 - Cartas do Vitek 2 Compact**

A interpretação das reações é efetuada por um sistema ótico de transmitância usando diferentes comprimentos de onda no espectro do visível. Para a realização do antibiograma existem cartas específicas com diferentes antibióticos. O equipamento inclui uma base de dados informática que analisa os padrões de CMI e deteta fenótipos para a maioria dos microrganismos testados, além de permitir a leitura interpretativa do antibiograma e a deteção dos mecanismos de resistência aos antibióticos.

## **17. Meios de Cultura**

- **Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS – bioMérieux)**

Meio não seletivo usado para o crescimento de espécies bacterianas fastidiosas e exigentes e avaliação da presença e tipo de hemólise.

- **Gelose Chocolate Polyvitex** (PVX – bioMérieux)

Meio enriquecido, não seletivo obtido a partir da gelose Columbia, pelo aquecimento da mistura com sangue a 80°C (hemólise dos eritrócitos). Favorece o crescimento de estirpes fastidiosas pertencentes ao género *Neisseria* e *Haemophilus*.

- **Meio de Chapman** (MSA2 – bioMérieux)

Meio seletivo para o isolamento de *Staphylococcus spp.* No MSA2 (Manitol Salt Agar), a elevada concentração de cloreto de sódio (NaCl) inibe a maior parte dos Gram negativo e a fermentação do manitol permite a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*.

- **Meio de CLED** (Cistina-Lactose-Deficiente de Eletrólitos)

Meio não seletivo, diferencial, habitualmente utilizado para cultura de amostras de urina, que permite o isolamento dos agentes mais frequentes de infeção urinária e quantificação de colónias. A deficiência de eletrólitos inibe o *swarming* de *Proteus spp* e a lactose permite diferenciar os fermentadores dos não fermentadores.

- **Meio de MacConkey**

Meio de isolamento seletivo e de diferenciação para bacilos Gram negativo (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp*) Os sais biliares inibem o crescimento da maioria das bactérias Gram positivo. A presença de lactose permite diferenciar as bactérias fermentadoras das não fermentadoras.

- **Meio SS** (Salmonella Shigella)

Meio de isolamento seletivo e de diferenciação para *Salmonella spp* e *Shigella spp*. O meio é inoculado a partir de amostras de fezes, de suspensões de fezes ou de meios de enriquecimento. O meio deteta colónias que fermentam a lactose e reduzem o tiosulfato, com produção de H<sub>2</sub>S. Neste meio há inibição dos coliformes pelo verde brilhante e sais biliares.

- **Meio Hektoen**

Meio de isolamento seletivo e de diferenciação para *Salmonella spp* e *Shigella spp*. O meio é inoculado a partir de amostras de fezes, de suspensões de fezes ou de meios



de enriquecimento. Os sais biliares inibem os Gram positivo e retardam o crescimento de algumas *Enterobacteriaceae*.

- **Meio de Selenito**

Meio líquido de enriquecimento para *Salmonella spp.* O selenito de sódio inibe a maioria das *Enterobacteriaceae*, incluindo algumas estirpes de *Shigella spp.* A subcultura para meio sólido deve ocorrer entre as 6 e as 12 horas, pois este o prazo médio de inibição de outras estirpes.

- **Meio de Muller-Hinton (MH2 - bioMérieux)**

Meio não seletivo usado principalmente para o estudo da susceptibilidade aos antimicrobianos.

- **Meio CPS (bioMérieux)**

Meio para o isolamento, contagem e identificação direta de *E. coli*, *Proteus spp* e *Enterococcus spp* em amostras de urina. Este meio contém substratos específicos das atividades enzimáticas a serem detetadas:

- *E. coli*:  $\beta$ - glucuronidase (não é necessário o teste do indol)
- *Proteus spp*: coloração espontânea de colónias que produzem desaminase (não é necessário o teste adicional de TODA)
- *Enterococcus spp*:  $\beta$ - glucosidase

- **Meio de Sabouraud (com Gentamicina e Cloranfenicol)**

Meio seletivo recomendado para o isolamento de leveduras e fungos a partir de amostras polimicrobianas. A presença de gentamicina inibe muitas bactérias Gram positivas e Gram negativas. A presença de cloranfenicol melhora a seletividade para certas espécies que podem ser resistentes à gentamicina. O pH do meio é ligeiramente ácido, favorecendo mais o crescimento de fungos do que de bactérias.

- **Meio Strepto B ID (Meio Granada)**

Meio cromogénico para identificação de *Streptococcus agalactiae*.

- **Meio Candida ID (CAN2 - bioMérieux)**

Meio cromogénico para identificação de *Candida albicans*.

## **18. Métodos de Coloração e Testes de Identificação**

### **18.1 Coloração de Gram**

A técnica de coloração de Gram, descoberta pelo físico dinamarquês Hans Christian Gram em 1884, é uma técnica de coloração diferencial que permite distinguir os dois principais grupos de bactérias por microscopia ótica. O mecanismo clínico da diferenciação de Gram baseia-se na permeabilidade diferencial das paredes celulares com complexo cristal violeta-iodo. A coloração de Gram produz uma amostra na qual os microrganismos Gram-positivos apresentam uma tonalidade que varia entre o azul e o negro, e os microrganismos Gram-negativos variam entre o rosa e o vermelho. As bactérias Gram-positivo apresentam uma parede espessa, homogênea, geralmente não estratificada e predominantemente constituída por peptidoglicano. Deste modo, o precipitado insolúvel que se forma por ação do mordente, fica retido no interior da célula pela camada espessa de peptidoglicano, logo, estas células não são descoradas permanecendo com a coloração conferida pelo corante primário (púrpura).

As bactérias Gram-negativo apresentam uma parede estratificada constituída por uma membrana externa e por uma camada mais interna que contém peptidoglicano e que é mais fina que a das Gram-positivo. Deste modo, o precipitado insolúvel, que se forma por ação do mordente, é removido (camada de peptidoglicano é mais fina que a das Gram-positivo e a membrana externa é parcial ou totalmente solubilizada pelo agente descolorante), pelo que as células ficam descoloradas, corando de vermelho pelo contrastante.

Desta forma, a diferente estrutura da parede bacteriana e, em particular a espessura da camada de peptidoglicano, é a responsável pelo diferente comportamento das bactérias face à coloração de Gram.

Esta técnica é ainda a mais frequentemente solicitada nos laboratórios de microbiologia clínica, mesmo estando descrita há mais de um século (3).

#### **18.1.1. Reagentes**

- Água destilada
- Cristal violeta (corante primário)
- Lugol (mordente)
- Mistura álcool/acetona (agente descolorante)
- Safranina (contrastante)

### **18.1.2. Procedimento**

Tratar a amostra, previamente fixada em lâmina pelo calor, da seguinte forma sequencial:

- Adicionar algumas gotas de cristal de violeta até cobrir a amostra (1 min.);
- Lavar com água;
- Adicionar algumas gotas de lugol até cobrir a amostra (1 min.);
- Lavar com água;
- Adicionar algumas gotas de álcool/acetona até cobrir a amostra (5 seg.);
- Lavar com água;
- Adicionar algumas gotas de safranina até cobrir a amostra (2 min.);
- Lavar com água;
- Limpar a lâmina

### **18.2. Coloração de Kinyoun**

O método de coloração de Kinyoun é uma técnica de coloração similar à coloração de Ziehl Neelsen, mas realizada a frio, ou seja, não é necessário aquecer o corante primário. O fundamento desta técnica de coloração baseia-se na capacidade de alguns microorganismos reterem os corantes complexos básicos (tais como carbolfucsina) após forte descoloração com álcool-ácido. A resistência aos ácidos depende do elevado conteúdo em lípidos (ácidos micólicos e ácidos gordos de cadeias longas) das paredes celulares das micobactérias. Este método tem um protocolo mais simples e por isso tem sido mais utilizado que a coloração Ziehl-Neelsen no laboratório Clínico (3).

#### **18.2.1. Reagentes**

- Água destilada
- Carbolfucsina de Kinyoun (corante primário)
- Mistura álcool/ácido (agente descolorante)
- Azul de Metileno (contrastante)

### **18.2.2. Procedimento**

Tratar a amostra, previamente fixada em lâmina pelo calor, da seguinte forma sequencial:

- Cobrir a lâmina com a solução de carbolfucsina de Kinyoun e deixar atuar 5 minutos;
- Lavar com água;
- Cobrir a lâmina com álcool-ácido a 3% e deixar atuar 2 minutos;
- Lavar com água e retirar o excesso;
- Cobrir a lâmina com contra-coloração (ex. azul de metileno) e deixar atuar 1-2 min.;
- Lavar com água e deixar secar

### **18.3. Métodos de Concentração de Parasitas nas Fezes**

#### **18.3.1. Flutuação em Solução Saturada de Cloreto de Sódio (WILLIS, 1921)**

- Colocar uma quantidade de fezes de aproximadamente 2 g coletada de várias partes do bolo fecal, em tubo de vidro de 3 cm de diâmetro com capacidade aproximada de 20 ml. Completar  $\frac{1}{4}$  da capacidade do recipiente com solução saturada de cloreto de sódio.
- Suspende as fezes na solução saturada salina até haver uma total homogeneização.
- Colocar uma lamela em contato com o menisco durante 30 a 45 minutos; não deverá haver formação de bolhas de ar entre a lamela e a superfície do líquido. A gota contendo os ovos adere-se à face inferior da lamela.
- Remover a lamela e inverter rapidamente a sua posição sobre uma lâmina.
- Examinar ao microscópio com objetiva de pequena ampliação (10x).

Observações: Os ovos não flutuam na superfície do reagente quando a homogeneização do material fecal é incompleta, havendo uma imperfeita separação dos ovos e dos detritos fecais. A flutuação não deve superar mais os 60 minutos, com risco dos ovos que flutuam na superfície poderem sedimentar.

### **18.3.2. Centrifugo-Sedimentação pela Formalina-Éter, (RITCHIE, 1948)**

- Colocar 1 ou 2 g de fezes coletadas de várias partes do bolo fecal em frasco contendo 10ml de água corrente ou solução salina a 0,85%;
- Filtrar a suspensão através de gaze dobrada quatro vezes, e receber o filtrado num tubo cônico de centrífuga de 15 ml.
- Centrifugar (1500 rpm durante 3 min.);
- Decantar o sobrenadante e adicionar 1 a 2 ml de água corrente ou solução salina a 0,85% ao sedimento antes de o ressuspender. Completar com água corrente (ou solução salina a 0,85%) 2/3 do volume do tubo. Agitar e centrifugar (1500 rpm durante 3 min.).
- Repetir a etapa anterior, até que o sobrenadante se apresente relativamente claro.
- Depois que o último sobrenadante é decantado, ressuspender o sedimento com 1 a 2 ml de formalina a 10% (dar preferência à solução tamponada de formalina a 10%, pH. Neutro). Completar o volume da suspensão em 10 ml com formalina a 10%. Deixar em repouso durante 5 minutos.
- Adicionar 3 ml de éter, fechar o tubo e agitar vigorosamente, na posição invertida, por 30 minutos. Remover a tampa com cuidado.
- Centrifugar (1000 rpm durante 1 min.). Quatro camadas formar-se-ão: (1) sedimento no fundo do tubo contendo os parasitas, (2) camada de formalina, (3) tampão de detritos fecais, e (4) camada de éter na superfície.
- Separar o tampão de detritos das paredes do tubo com um estilete fino, e com cuidado, decantar as três camadas superiores. Limpar com zaragatoa de algodão as paredes do tubo, removendo os detritos remanescentes.
- Uma pequena quantidade de líquido que permanece nas paredes do tubo escorre para o fundo junto ao sedimento. Misturar o líquido e o sedimento, preparando as lâminas para a pesquisa de ovos, larvas e quistos.

### **18.4. Teste da Coagulase**

A coagulase é uma enzima termoestável produzida principalmente pelas estirpes de *S. aureus*. Existem duas formas de coagulase: uma “ligada/associada à parede celular” ou *Clumping factor* e outra libertada pela célula bacteriana que é a “coagulase livre” (3).

#### 18.4.1. Teste da Coagulase em Lâmina

Reagentes: Plasma de coelho citratado ou com EDTA (fornecido comercialmente desidratado). Após reconstituído deve ser refrigerado.

Princípio: A “coagulase ligada” ou *Clumping factor* atua diretamente no fibrinogénio plasmático e causa aglutinação das bactérias em agregados visíveis.

Procedimento:

- Preparar uma suspensão de colónias densa e bem emulsionada em água destilada;
- Agitar no vortex e colocar uma gota de suspensão na lâmina;
- Adicionar uma gota do plasma de coelho;
- Observar a existência ou não de aglutinação nos 10 a 15 segundos imediatos sem agitar a lâmina. (Reação positiva)

Limites e precauções: Um teste positivo da coagulase em lâmina só é válido para estirpes de *Staphylococcus spp.* que não apresentem autoaglutinação. A autoaglutinação é pesquisada efetuando uma suspensão de colónia numa gota de NaCl a 0,85% colocada numa lâmina de vidro.

#### 18.4.2. Teste da Coagulase em Tubo

Reagentes: Plasma de coelho citratado ou com EDTA (fornecido comercialmente desidratado). Pode ser refrigerado durante 10 dias ou congelado em tubos individuais durante vários meses.

Princípio: A coagulase livre (libertada pelas células) atua na protrombina originando uma substância semelhante à trombina, “trombina livre” que atua no fibrinogénio formando um coágulo de fibrina.

Procedimento:

- Num tubo com 0,5 ml do plasma de coelho inocular uma colónia isolada da cultura em estudo;
- Incubar a 35-37° C;
- Ao fim de 4h de incubação e sem agitar o tubo, verificar se existe formação de coágulo. (Reacção positiva);
- A ausência de coágulo às 4h implica a reincubação do tubo com leitura às 24h.

Limites e precauções: Pode ocorrer lise do coágulo antes da sua observação por produção de enzimas fibrinolíticas pela estirpe em estudo. (Falso negativo)

### 18.5. Teste da Catalase

As bactérias envolvidas na respiração anaeróbia, produzem na maior parte das vezes a enzima catalase. Esta enzima é responsável pela decomposição do peróxido de hidrogénio intracelular, um produto intermediário tóxico resultante do metabolismo aeróbico. Este teste é útil para diferenciar *Staphylococcus spp* (catalase-positivos) de *Streptococcus spp* (catalase-negativos) (3).

Reagentes: peróxido de hidrogénio a 3% (conservar à temperatura ambiente e no escuro).

Princípio: A enzima catalase desdobra o peróxido de hidrogénio (3%) em água e oxigénio ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ).

Procedimento:

- Com a ponta de uma pipeta de Pasteur ou com palito, transferir a colónia em estudo para a lâmina de vidro.
- Adicionar uma gota de peróxido de hidrogénio a 3% e observar imediatamente se existe ou não formação de bolhas de ar (Reacção positiva).
- É possível também fazer esta prova pela ordem inversa.

Limites e precauções:

Culturas com mais de 24h podem dar falsos negativos. Devido à existência de catalase nos eritrócitos, a prova deve ser interpretada com muito cuidado quando efetuada a partir de colónias retiradas de meios contendo sangue (possibilidade de falso positivo).

### 18.6. Teste da Oxidase

A citocromo c oxidase é uma enzima sintetizada por algumas bactérias aeróbicas, catalizando a reação terminal de transporte da cadeia de eletrões, a redução do oxigénio molecular a água. Este teste é útil para distinguir *Neisseria/Moraxella*,

membros da família *Vibrionaceae* e *Pseudomonas spp* e todos eles oxidase positiva. As *Enterobacteriaceae* são tipicamente oxidase negativa (3).

Reagentes: tetrametil-p- fenilenediamina dihidroclorato 1% (reagente de Kovac).

Princípio: As citocromo-oxidases são hemoproteínas que atuam como elo final na cadeia de respiração aeróbia transferindo eletrões (hidrogénio) para o oxigénio, com formação de água. O teste utiliza um corante que substitui o oxigénio como aceitador de hidrogénio (→ aparecimento de cor).

Procedimento:

**Técnica directa em placa** – colocar 2-3 gotas de reagente sobre colónias isoladas da bactéria a testar.

**Técnica indirecta sobre tira de papel** – utilizam-se tiras comerciais ou um papel de filtro onde se colocam algumas gotas de reagente. Com uma ansa (não metálica) retira-se uma colónia a testar que é colocada sobre o papel.

Interpretação: As colónias com bactérias que contenham a atividade da enzima desenvolvem uma cor azul-roxo escura em mais ou menos 10 segundos.

Limitação: Não devem ser usadas ansas de metal pois os produtos de oxidação do metal, que se formam aquando do aquecimento da ansa, podem provocar falsa reação positiva.

### 18.7. Prova de Filamentação

Reagentes: Soro humano.

Princípio: O teste permite fazer uma identificação presuntiva de *Candida albicans*, quando as leveduras são incubadas em soro ou plasma, a 37°C durante cerca de 2,5 horas. Somente esta espécie de leveduras forma tubos germinativos.

Procedimento:

- Emulsionar um pouco da suspensão de leveduras num tubo contendo 1 ml de soro humano.
- Incubar a 35°C, durante 2,5 horas. Recolher uma gota do sedimento e observar ao microscópio entre lâmina e lamela.



## 19. Produtos Biológicos e Parâmetros Analíticos

### 19.1. Aparelho Urinário

#### 19.1.1. Urina Assética (Urocultura)

A urina é um excelente meio de cultura e crescimento para a maioria dos microrganismos que infetam o trato urinário. As infeções do sistema urinário são muito frequentes no Homem e podem separar-se, do ponto de vista anatómico, em infeções das vias urinárias inferiores (Cistites e Uretrites) e infeções das vias urinárias superiores (Pielonefrites). A infeção urinária aguda é geralmente causada por bactérias da flora intestinal saprófita que invadem o trato urinário (1).

#### Colheita

O método de eleição é a micção espontânea. Sempre que não exista essa possibilidade tem que se recorrer a outros métodos, como punção supra púbica e cateterismo. É realizada com assépsia, após higiene com água e gaze estéril, aproveitando o jacto médio para frasco estéril.

#### 19.1.1.1. Exame Bacteriológico

- Exame Direto

Observação a fresco (entre lâmina e lamela), com avaliação de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, fungos, parasitas e outros elementos. Observação após coloração pelo Gram.

- Exame Cultural

Sementeira efetuada com ansa calibrada de 10 µL em meios CPS, permitindo a identificação direta dos principais agentes de infeção (*E.coli*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp* e *Enterococcus spp*) e a contagem em ufc/mL.

Incubação em aerobiose a 37°C durante 18 a 24 horas. Em casos de dúvida, a identificação realiza-se por método automatizado no equipamento Vitek 2 Compact.

Após isolamento e identificação do agente patogénico, procede-se à execução de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

#### **19.1.1.2. Exame Micológico**

Observação microscópica do sedimento urinário para pesquisa de leveduras, confirmado pelo teste da Blastese. Exame cultural com sementeira em CAN2, meio cromogénico que permite a identificação direta de *Candida albicans*. Incubação em aerobiose – 37°C, 24 a 48 horas.

#### **19.1.1.3. Exame Parasitológico**

Observação microscópica do sedimento urinário para pesquisa de parasitas. Os mais vulgarmente encontrados são os trofozoítos de *Trichomonas spp.*

#### **19.1.1.4. Pesquisa de BK (Bacilo de Koch)**

Observação microscópica de sedimento urinário corado pelo método de Kinyoun. Analisam-se normalmente três amostras obtidas em dias consecutivos.

### **19.2. Aparelho Gastrointestinal**

#### **19.2.1. Fezes**

As coproculturas são realizadas para identificar bactérias associadas à doença entérica. As fezes é o produto biológico analisado no laboratório clínico que tende a conter o maior número e a maior variedade de microrganismos, por isso recomenda-se colher três coproculturas em dias separados (1). A colheita deve ser feita com o auxílio de uma espátula estéril para um frasco esterilizado e entregue o mais rápido possível no laboratório sem refrigeração.

#### **19.2.1.1. Exame Bacteriológico**

- Exame Direto

Exame macroscópico para observação de parasitas, muco, sangue e consistência das fezes.

Exame microscópico para observação de leucócitos, leveduras e parasitas.

- Exame Cultural

Sementeira efetuada nos meios de MacConkey, Hektoen e SS, sendo o enriquecimento da amostra em caldo de Selenito. Incubação em aerobiose a 37°C durante 18 a 24 horas. Do caldo de Selenito, após 12 horas de incubação, faz-se nova sementeira em meios Hektoen e MacConkey.

Com os meios usados foram pesquisados *Salmonella spp.*, *Shigella spp* e *Staphylococcus aureus*. O meio SS permite a identificação direta de *Salmonella spp* e *Shigella spp*. A identificação de *S. aureus* foi realizada recorrendo a Gram da cultura e repicagem em meio Chapman.

Em casos de dúvida, a identificação realiza-se por método automatizado no equipamento Vitek 2 Compact. Após isolamento e identificação do agente patogénico, procede-se à execução de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

#### **19.2.1.2. Exame Micológico**

Sementeira em CAN2, meio cromogénico que permite a identificação direta de *Candida albicans*. Incubação em aerobiose a 37°C, 24 a 48 horas.

#### **19.2.1.3. Exame Parasitológico**

As amostras de fezes devem ser examinadas macroscopicamente para determinar a consistência, o odor, a cor, a presença ou ausência de sangue, de muco, de proglotes e de vermes adultos ou outras condições anormais. Consequentemente, o exame macroscópico deve sempre anteceder o exame microscópico.

No Hemobiolab, o exame microscópico direto das fezes é efetuado com e sem soluto de Lugol e após concentração pelo método de Willis (flutuação) e de Ritchie (sedimentação).

### **19.3. Aparelho Respiratório Superior**

As infeções das vias respiratórias superiores (laringe, orofaringe, nasofaringe e fossas nasais, os seios perinasais e o ouvido médio) são bastante frequentes, sendo na sua maior parte de etiologia viral e autolimitadas. O diagnóstico bacteriológico tem de ter

em conta a flora normal da região, normalmente uma flora mista, constituída por aeróbios e anaeróbios. A identificação de uma bactéria patogénica ou potencialmente patogénica não indica necessariamente infeção.

### **19.3.1. Exsudado Orofaríngeo**

As culturas da orofaringe podem ser usadas para detetar o estado de portador de pessoas que abrigam uma grande variedade de microrganismos, entre os quais *Streptococcus pyogenes* ( $\beta$ -hemolítico do grupo A) (1).

- Colheita

Efetuada preferencialmente em jejum, antes de qualquer higiene local. É realizada com zaragatoa estéril, colhendo o exsudado da faringe posterior ou amígdalas, deprimindo a língua com espátula, evitando o contacto com a cavidade bucal e, especialmente, com saliva.

#### **19.3.1.1. Exame Bacteriológico**

- Exame Direto

De difícil interpretação devido à abundante flora mista, a observação do Gram do esfregaço faríngeo pode ser orientativa, caso se observem abundantes leucócitos polimorfonucleares e cocos Gram positivos.

- Exame Cultural

A sementeira é efetuada em Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro. Incubação em aerobiose a 37°C durante 24 a 48 horas. A identificação do *Streptococcus  $\beta$ -hemolítico grupo A* foi realizada recorrendo à observação de  $\beta$ -hemólise, coloração de Gram, teste de sensibilidade à bacitracina e teste de aglutinação em látex para identificação do grupo de Lancefield.

Em casos de dúvida, a identificação realiza-se por método automatizado no equipamento Vitek 2 Compact. Não se executa antibiograma uma vez que não são conhecidas resistências desta estirpe à penicilina.

### 19.3.2. Exsudado Nasofaríngeo

O exsudado da nasofaringe é uma amostra ideal para a detecção de *Bordetella pertussis*, no entanto também é possível o diagnóstico de infecções bacterianas por *Staphylococcus aureus* (1).

- Colheita

Realizada com zaragatoa estéril a nível das narinas e faringe, rodando suavemente contra a mucosa nasal.

#### 19.3.2.1. Exame Bacteriológico

- Exame Direto

A coloração de Gram do esfregaço nasofaríngeo pode ser orientativa.

- Exame Cultural

A sementeira foi efetuada em meio de Chapman. Incubação em aerobiose a 37°C durante 24 a 48 horas. A fermentação do manitol no meio de Chapman orienta para identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*, juntamente com o Gram da cultura. Em casos de dúvida, a identificação realiza-se por método automatizado no equipamento Vitek 2 Compact. Após isolamento e identificação do agente patogénico, procede-se à execução de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

### 19.4. Aparelho Respiratório Inferior

O trato respiratório inferior (traqueia, brônquios, bronquíolos e parênquima pulmonar) da maioria dos indivíduos são não alberga microflora comensal. Dos vários tipos de amostra utilizados para pesquisa de infeções no trato respiratório inferior, a que apresenta maior expressão no Hemobiolab é a Expetoração.

- Colheita

A amostra deve ser obtida por tosse profunda, apresentando-se tingida de sangue e pús. Recomenda-se que seja a primeira da manhã após gargarejo com água, já que o diagnóstico das infeções respiratórias inferiores é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras por flora comensal da orofaringe durante a colheita.

#### **19.4.1. Exame Bacteriológico**

- Exame Direto

A coloração de Gram da expetoração é importante na avaliação da flora presente, servindo de orientação para o exame cultural. É considerada amostra representativa a que contém grande quantidade de leucócitos polimorfonucleares e poucas células epiteliais, observados com a objetiva de pequena ampliação (10X).

- Exame Cultural

A sementeira foi efetuada nos meios de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro, Gelose Chocolate Polyvitex, Chapman e MacConkey. Incubação em aerobiose dos meios de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro, Chapman e MacConkey a 37°C durante 24 a 48 horas, e em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> do meio de Gelose Chocolate Polyvitex a 37°C, 24 a 48h. Em casos de dúvida, a identificação realiza-se por método automatizado no equipamento Vitek 2 Compact. Após isolamento e identificação do agente patogénico, procede-se à execução de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

#### **19.4.2. Pesquisa de BK (Bacilo de Koch)**

Observação microscópica de esfregaço da expetoração corado pela técnica de Kinyoun. Analisam-se normalmente três amostras obtidas em dias consecutivos.

#### **19.5. Aparelho Genital**

Nos laboratórios de rotina, a amostra mais analisada do aparelho genital feminino é o exsudado vaginal. Outras amostras passíveis de ser analisadas são o exsudado uretral, abcessos (fundos de saco, trompas e glândulas de Bartholin) e úlceras genitais. A etiologia infecciosa é normalmente de transmissão sexual ou relacionada com o desequilíbrio da flora comensal, na parte baixa, e resultante da evolução de infeções baixas, do parto ou de técnicas invasivas, na parte alta do trato.

No aparelho genital masculino a principais amostras é o exsudado uretral, mas também podem ser analisadas úlceras genitais e abcessos (epidídimo, próstata e

testículos). Os exsudados rectais são normalmente considerados também no aparelho genital.

### **19.5.1. Exsudado Vaginal**

- Colheita

A colheita é executada, após introdução de espéculo, sem lubrificante, colhendo o exsudado do fundo do saco posterior ou paredes da vagina com zaragatoa estéril. São colhidas duas zaragatoas, uma para lâminas, depois colocada em tubo com soro fisiológico estéril e outra para cultura, colocada em meio de transporte.

#### **19.5.1.1. Exame Bacteriológico**

- Exame Direto

Exame microscópico direto a fresco, para observação de leucócitos, pesquisa de elementos leveduriformes e trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*. Observação de esfregaço corado pelo Gram para descrição da flora existente.

- Exame Cultural

A sementeira foi efetuada nos meios de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro, Gelose Chocolate Polyvitex e MacConkey. Incubação em aerobiose da Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro e MacConkey a 37°C durante 24 a 48 horas, e em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> para a Gelose Chocolate Polyvitex a 37°C, 48 a 72h. A identificação é realizada por coloração de Gram, prova da oxidase e catalase.

Em casos de dúvida, a identificação realiza-se por método automatizado no equipamento Vitek 2 Compact.

Após isolamento e identificação do agente patogénico, procede-se à execução de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

#### **19.5.1.2. Exame Micológico**

Observação do exame microscópico direto a fresco. Sementeira efetuada nos meios de CAN2 a 37°C em aerobiose durante 24 a 48 horas, meio cromogénico que permite a identificação de *Candida albicans*. Esta deve ser complementada pela prova da filamentação ou blastese.

#### **19.5.1.3. Exame Parasitológico**

O exame parasitológico baseia-se na observação do exame microscópico direto a fresco.

### **19.5.2. Exsudado Uretral Masculino**

- Colheita

A colheita é executada pelo menos duas horas após a última micção, após limpeza da mucosa circundante com gaze estéril, introduzindo zaragatoa na uretra (2 a 4 cm), rodando com pressão e esperando um pouco até impregnar. São colhidas duas zaragatoas: uma para lâminas (depois colocada em tubo com soro fisiológico estéril) e outra para cultura (colocada em meio de transporte).

#### **19.5.2.1. Exame Bacteriológico**

- Exame Direto

Exame microscópico direto a fresco, para observação de leucócitos e trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*. Observação de esfregaço corado pelo Gram para descrição da flora existente.

- Exame Cultural

A sementeira foi efetuada nos meios de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro, Gelose Chocolate Polyvitex e MacConkey. Incubação em aerobiose da Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro e MacConkey a 37°C durante 24 a 48 horas, e em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> para a Gelose Chocolate Polyvitex a 37°C, 48 a 72h. A identificação é realizada por coloração de Gram, prova da oxidase e catalase.



Em casos de dúvida, a identificação realiza-se por método automatizado no equipamento Vitek 2 Compact. Após isolamento e identificação do agente patogénico, procede-se à execução de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

No Hemobiolab, efetua-se um teste imunocromatográfico para a deteção direta do antígeno de *Chlamydia*. Para recolha de células usava-se zaragatoa endocervical (nas mulheres) ou zaragatoa uretral ou urina (nos homens).

#### **19.5.2.2. Exame Micológico**

Sementeira efetuada nos meios de CAN2 a 37°C em aerobiose durante 24 a 48 horas, meio cromogénico que permite a identificação de *C. albicans*. Esta deve ser complementada pela prova da filamentação ou blastese.

#### **19.5.2.3. Exame Parasitológico**

O exame parasitológico baseia-se na observação do exame microscópico direto a fresco.

#### **19.5.3. Espermocultura**

A espermocultura pode elucidar a presença de infeções nas glândulas acessórias do aparelho genital masculino, como uma prostatite ou prostovesiculite.

- Colheita

O líquido seminal é obtido por masturbação.

Para a espermocultura não há necessidade de abstinência sexual. Deve ser preferencialmente colhido no laboratório, o paciente deve urinar antes da colheita e fazer uma higiene prévia, lavando bem as mãos e o pénis com bastante água e sabão e secando com gaze estéril ou toalha limpa. A colheita deve ser feita em frasco estéril.

- Exame Direto

Observação orientativa de esfregaço corado pelo Gram para descrição da flora existente.

- Exame Cultural

A sementeira foi efetuada nos meios de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro, Gelose Chocolate Polyvitex e Chapman. Incubação em aerobiose dos meios de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro, Chapman a 37°C durante 24 a 48 horas, e em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> do meio de Gelose Chocolate Polyvitex a 37°C, 24 a 48h. A identificação é realizada por coloração de Gram, prova da oxidase e coagulase.

Em casos de dúvida, a identificação realiza-se por método automatizado no equipamento Vitek 2 Compact. Após isolamento e identificação do agente patogénico, procede-se à execução de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

### **19.6. Exsudados auriculares**

A otite pode ser um processo infeccioso da mucosa do ouvido médio (otite média). As otites médias são muito frequentes em bebés e crianças. A otite externa é uma infeção localizada no canal auditivo externo, acompanhado por vezes de exsudado mucopurulento que pode fluir para o exterior.

- Colheita

A colheita deverá ser realizada com zaragatoa estéril, a nível do canal auditivo externo, colhendo o possível muco purulento.

#### **19.6.1. Exame Bacteriológico**

- Exame Direto

A coloração de Gram do esfregaço auricular pode ser orientativa.

- Exame Cultural

Sementeira efetuada nos meios de MacConkey, Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro e Gelose Chocolate Polyvitex. Incubação em aerobiose dos meios de MacConkey e Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro a 37°C durante 24 a 48 horas, e em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> do meio de Gelose Chocolate Polyvitex a 37°C, 24 a 48h. As geloses de sangue e chocolate foram usadas na possibilidade de nos

encontrarmos perante uma otite média com perfuração do tímpano e exsudação externa.

Em casos de dúvida, a identificação realiza-se por método automatizado no equipamento Vitek 2 Compact. Após isolamento e identificação do agente patogénico, procede-se à execução de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

#### **19.6.2. Exame Micológico**

Observação do exsudado a fresco pesquisando formas leveduriformes ou filamentosas. A sementeira foi efetuada no Meio de Sabouraud (com Gentamicina e Cloranfenicol) para fungos filamentosos com incubação a 30-35°C, 3 a 7 dias em aerobiose; e em CAN2 meio cromogénico que permite a identificação direta de *Candida albicans* incubada em aerobiose, 37°C, 24 a 48 horas.

#### **19.7. Exsudado Ocular**

As infeções oculares podem ser divididas em infeções das estruturas externas e internas do olho e do sistema lacrimal. As indicações para a investigação bacteriológica são determinadas pela localização da infeção (ocular ou peri-ocular), pela sua gravidade e pelo conhecimento dos principais agentes implicados.

- Colheita

A colheita efetua-se usando duas zaragatoas humedecidas em soro fisiológico estéril, uma em cada olho.

##### **19.7.1. Exame Bacteriológico**

- Exame Direto

Observação orientativa de esfregaço corado pelo Gram para descrição da flora existente.

- Exame Cultural

A sementeira foi efetuada nos meios de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro e Gelose Chocolate Polyvitex. Incubação em aerobiose da Gelose Columbia + 5% de

sangue de carneiro a 37°C durante 24 a 48 horas, e em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> para a Gelose Chocolate Polyvitex a 37°C, 24 a 48h. A identificação é realizada por Gram, provas da catalase, oxidase e coagulase.

Em casos de dúvida, a identificação realiza-se por método automatizado no equipamento Vitek 2 Compact. Após isolamento e identificação do agente patogénico, procede-se à execução de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

#### **19.7.2. Exame Micológico**

Sementeira em Meio de Sabouraud (com Gentamicina e Cloranfenicol) em aerobiose 37°C, 24h a 4 dias, quando observadas estruturas fúngicas no exame microscópico.

### **19.8. Exsudados Purulentos**

A história clínica, o local e tipo de infeção tipo e modo de colheita, devem ser levados em conta para a escolha da metodologia de estudo microbiológico de qualquer exsudado purulento.

No Hemobiolab, os exsudados purulentos mais comuns eram os de feridas superficiais abertas.

- Colheita

A colheita é realizada, após desinfeção da zona de pele ao redor da ferida e lavagem da superfície da lesão com água destilada ou com soro fisiológico. É utilizada uma zaragatoa estéril, colocada em meio de transporte, após desbridamento dos tecidos necrosados.

#### **19.8.1. Exame Bacteriológico**

- Exame Direto

Observação orientativa de esfregaço corado pelo Gram para descrição da flora existente.

- Exame Cultural

A sementeira foi efetuada nos meios de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro, MacConkey e Chapman. Incubação em aerobiose das Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro, MacConkey e Chapman a 37°C durante 24 a 48 horas.

A identificação é realizada por coloração de Gram, provas da catalase, coagulase e oxidase.

Em casos de dúvida, a identificação realiza-se por método automatizado no equipamento Vitek 2 Compact.

Após isolamento e identificação do agente patogénico, procede-se à execução de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

### **19.8.2. Exame Micológico**

Sementeira em Sabouraud+Cloranfenicol+Gentamicina em aerobiose 30 a 35°C, 24h a 4 dias, quando observadas estruturas fúngicas no exame microscópico.

## **20. Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos (TSA)**

Um antibiograma é um ensaio que mede a suscetibilidade ou resistência de uma bactéria aos antibióticos através do espetro de sensibilidade identificados na placa de cultura. Este teste deve realizar-se para qualquer microrganismo identificado como responsável por um processo infeccioso e para o qual não seja possível prever a suscetibilidade.

Utilizou o método difusão em placa de Kirby-Bauer. O teste é feito utilizando-se discos impregnados de antibióticos depositados sobre a superfície do Meio de Muller-Hinton onde se inoculou, por espalhamento, uma amostra da cultura bacteriana previamente isolada.

Após incubação (16 a 18 horas) utiliza-se uma régua para determinar os diâmetros (em mm) dos halos de inibição de crescimento para cada disco. Tendo como base a tabela de sensibilidade dos discos de antibióticos, os resultados são comparados de forma a verificar a eficácia de cada antibiótico em inibir o crescimento das bactérias cultivadas (Sensível ou Suscetível, Sensibilidade Intermédia, Resistente).

Em casos de antibiogramas de bactérias multirresistentes ou que, pelo método de rotina suscitaram interpretações duvidosas, o TSA realiza-se por método automatizado no equipamento Vitek 2 Compact.

## **21. Bibliografia**

- (1) Fischbach FT, Dunning III MB. Manual de enfermagem - exames laboratoriais e diagnósticos. 7ª ed. Brasil: Guanabara Koogan S.A.; 2005
- (2) Pagana KD, Pagana TJ. Manual de testes diagnósticos e laboratoriais. 1ª ed. Brasil: Guanabara Koogan S.A.; 2001
- (3) Sacher RA, McPherson RA, Campos JM. Widmann interpretação clínica dos exames laboratoriais. 11ª ed. Brasil: Editora Manole; 2002
- (4) Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical chemistry: theory, analysis, correlation. 5<sup>th</sup> ed. United States of America: Mosby Inc.; 2010
- (5) McPherson RA, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 21<sup>th</sup> ed. China: Saunders Elsevier; 2007
- (6) Davidsohn I, Henry JB. Todd-Sanford Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6ª ed. Espanha: Salvat Editores; 1978
- (7) Grupos sanguíneos eritrocitários. Disponível em [http:// www.isbtweb.org](http://www.isbtweb.org) [acedido em 18/06/2012]
- (8) Arosa FA, Cardoso EM, Pacheco FC. Fundamentos de Imunologia. 1ª ed. Portugal: Lidel – Edições Técnicas; 2007
- (9) Parham P. O sistema imune. Brasil: Artmed; 2001
- (10) Bulas de reagentes